



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COLONIZAÇÃO NASAL POR STAPHYLOCOCCI METICILINA-RESISTENTE EM
PORTADORES HUMANOS SAUDÁVEIS EM CONTACTO DIÁRIO PROFISSIONAL
COM ANIMAIS: FREQUÊNCIA E ESTUDO DE SEGUIMENTO

ANA CATARINA DE JESUS LOPES RODRIGUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de

Oliveira

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira

Pomba

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COLONIZAÇÃO NASAL POR STAPHYLOCOCCI METICILINA-RESISTENTE EM
PORTADORES HUMANOS SAUDÁVEIS EM CONTACTO DIÁRIO PROFISSIONAL
COM ANIMAIS: FREQUÊNCIA E ESTUDO DE SEGUIMENTO

ANA CATARINA DE JESUS LOPES RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de

Oliveira

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira

Pomba

2015

LISBOA

Aos meus avós, aos meus pais e ao meu irmão...

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, principalmente aos meus pais e avós, por acreditarem em mim e por me apoiarem sempre.

Ao meu orientador, o Dr. Luís Cruz, pela oportunidade de estágio no HVL e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada também pelo interesse na realização desta dissertação e pela pronta vontade de participação na mesma.

À minha co-orientadora, a Professora Doutora Maria Constança Pomba, por me ter aceitado no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas e por ter possibilitado a realização deste projeto. Obrigada também pela simpatia, paciência e pronta disponibilidade sempre que necessário.

Ao Professor Luís Telo da Gama pela disponibilidade e ajuda preciosa na análise estatística dos dados.

A toda a equipa do HVL, nomeadamente Dra. Carmen, Dr. Francisco, Dr. Márcia, Rita, Mariana, Beatriz, Joana, Juliana, Sandra, Catarina, pelos conhecimentos transmitidos, pela simpatia e pelos bons e maus momentos. Aos meus colegas que me acompanharam durante o estágio, nomeadamente Ana Viana, Catarina Ruivo, Catarina Leitão e Liliana Félix.

A todas as pessoas do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Natacha Couto, Cátia Marques, Adriana Belas e Laura Fernandes, pela amizade, disponibilidade e por todos os momentos. Um agradecimento muito especial à Natacha Couto pela ajuda na escolha deste tema de estudo, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos e pela ajuda preciosa e indispensável na elaboração e correção do presente documento.

A todas as pessoas que aceitaram participar neste projeto de investigação. Obrigada também à APMVEAC por ter permitido a recolha de amostras durante o seu congresso nacional.

Às minhas amigas e colegas de faculdade que me acompanharam ao longo deste percurso académico e com as quais partilhei bons e maus momentos, Patrícia, Luísa, Mariana, Xana, Carol e Sónia.

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

Colonização nasal por staphylococci metilina-resistente em portadores humanos saudáveis em contacto diário profissional com animais: frequência e estudo de seguimento

Os staphylococci metilina-resistente (MRS) são agentes oportunistas de grande importância em Medicina Humana e Veterinária. Os objetivos deste estudo consistiram em investigar colonização nasal e persistência de MRS em pessoas em contacto diário profissional com animais e identificar possíveis fatores de risco associados a colonização. Assim, foram obtidas zaragoas nasais de 71 médicos veterinários, 34 estudantes de Medicina Veterinária e Enfermagem Veterinária, 14 auxiliares e 10 enfermeiros veterinários. A pesquisa de MRS foi realizada em agar manitol com sal e em agar Brilliance™ MRSA2. A identificação das espécies foi obtida por PCR espécie-específicos. A resistência à metilina foi confirmada por PCR com amplificação dos genes *mecA* e *mecC*. As estirpes foram caracterizadas por tipagem SCC*mec*, *spa*, MLST e PFGE. As pessoas colonizadas por MRS foram contactadas para participarem no estudo de seguimento. Foram detetadas 79 (61%) pessoas colonizadas por, pelo menos, uma espécie de MRS [*S. epidermidis* (MRSE, n=68), *S. aureus* (MRSA, n=19), *S. haemolyticus* (MRSH, n=7), *S. pseudintermedius* (MRSP, n=2) e outros staphylococci coagulase-negativo (n=4)]. Entre as estirpes MRSA (n=7) foram identificadas 3 linhagens: ST22-t032-IV (n=3), principal clone nosocomial humano em Portugal, ST398-t108-V (n=3), MRSA associado a animais de produção, e ST105-t002-II (n=1), clone relacionado ao Nova Iorque/Japão. As estirpes MRSP pertenciam ao clone Europeu ST71-II-III. As estirpes MRSE (n=5) foram identificadas como ST5 (n=2) e ST35 (n=3), ambas pertencentes ao CC5, o qual é o predominante no Homem e nos animais de companhia em Portugal. Foram identificados como fatores de risco: i) ser profissional veterinário (médico veterinário, enfermeiro e auxiliar veterinário) ($P < 0.0001$, odds ratio [OR]=6.369, [2.683-15.122]), comparativamente a ser estudante; e ii) ter contactado com um animal positivo para MRSA ou MRSP ($P=0.0361$, OR=2.742, [1.067-7.045]). O estudo de seguimento, realizado em 54 pessoas, permitiu verificar que a maioria (85%) continuava colonizada, ao fim de 1 a 4 meses, por uma das espécies de MRS iniciais, devendo-se esta persistência à presença da mesma estirpe (MRSA e MRSP) ou à aquisição sucessiva de estirpes (MRSE). Este estudo confirma a presença de MRS na prática clínica veterinária em Portugal, sendo necessário implementar medidas de prevenção e controlo de infeção para minimizar a disseminação dos mesmos.

Palavras-Chave: colonização, persistência, profissionais veterinários, disseminação, MRS, Portugal

Abstract

Nasal colonization by methicillin-resistant staphylococci in healthy people in professional daily contact with animals: frequency and a follow-up study

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) are opportunistic agents of great importance in Human and Veterinary Medicine. The objectives of this study were to assess the frequency of nasal colonization and persistence of MRS in people with professional daily contact with animals and to identify possible risk factors associated with colonization. Therefore, nasal swabs were collected from 71 veterinarians, 34 veterinary and nursing students, 14 technicians and 10 veterinary nurses. MRS were screened on Mannitol Salt Agar and Brilliance™ MRSA2 agar. Species identification was obtained by species-specific PCR. Methicillin-resistance was confirmed by PCR amplification of the *mecA* and *mecC* genes. Strains were characterized by SCC*mec*, *spa*, MLST and PFGE typing. People colonized by MRS were contacted to participate in the follow-up study. Seventy-nine (61%) people were found to be colonized by, at least, one MRS specie [*S. epidermidis* (MRSE, n=68), *S. aureus* (MRSA, n=19), *S. haemolyticus* (MRSH, n=7), *S. pseudintermedius* (MRSP, n=2) and other coagulase-negative staphylococci (n=4)]. Among the MRSA strains (n=7) 3 lineages were identified: ST22-t032-IV (n=3), the major human healthcare clone in Portugal, ST398-t108-V (N=3), the livestock-associated MRSA, and ST105-t002-II (n=1), the New York/Japan related clone. MRSP strains belonged to the European clone ST71-II-III. MRSE strains (n=5) were identified as ST5 (n=2) and ST35 (n=3), both belonging to CC5, which is prevalent in Humans and companion animals in Portugal. Were identified as risk factors: i) being a veterinary professional (veterinarian, veterinary technician and nurse) ($P<0.0001$, odds ratio [OR]=6.369, [2.683-15.122]), versus being a student; and ii) have contacted with one MRSA- or MRSP-positive animal ($P=0.0361$, OR=2.742, [1.067-7.045]). The follow-up study, carried out in 54 people, showed that the majority (85%) remain colonized, after 1 to 4 months, by one of the initial MRS species, with this persistence being due to the presence of the same strain (MRSA and MRSP) or successive strains acquisition (MRSE). This study confirms the presence of MRS in veterinary clinical practice in Portugal, being necessary to implement infection control and preventive measures to minimize their spread.

Keywords: colonization, persistence, veterinary professionals, dissemination, MRS, Portugal

Índices

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índices.....	vii
1. Prefácio	1
2. Introdução	3
2.1. Staphylococci	3
2.1.1. Staphylococci coagulase-positivo (“coagulase-positive staphylococci”, CoPS)	3
2.1.2. Staphylococci coagulase-negativo (“coagulase-negative staphylococci”, CoNS)	4
2.1.3. Resistência à meticilina – genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i>	5
2.1.4. Cassete cromossomal <i>mec</i> de staphylococci	7
2.1.5. A problemática da multirresistência em staphylococci	10
2.1.6. Métodos epidemiológicos de tipagem	10
2.1.6.1. Eletroforese em gel de campo pulsado	11
2.1.6.2. Sequenciação de múltiplos <i>loci</i>	11
2.1.6.3. Tipagem <i>spa</i>	13
2.1.6.4. Tipagem <i>SCCmec</i>	14
2.1.7. Clones predominantes de MRS no Mundo e Portugal	14
2.1.7.1. MRSA	14
2.1.7.1.1. MRSA associado ao Hospital	14
2.1.7.1.2. MRSA associado à comunidade	16
2.1.7.1.3. MRSA em animais	17
2.1.7.1.4. MRSA em Portugal	20
2.1.7.2. MRSP	22
2.1.7.3. MR-CoNS	24
2.2. Situação atual da colonização por MRS na comunidade Médico-Veterinária	26
2.3. Padrão de Colonização	27
3. Objetivos	29
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Amostra populacional	29
4.2. Recolha das amostras e questionário	30
4.3. Isolamento bacteriano e caracterização	30
4.3.1. Isolamento	30
4.3.2. Extração de ADN	31
4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”, PCR)	31

4.3.3.1. Confirmação do género e identificação da espécie	31
4.3.3.2. Identificação do gene <i>mecA</i>	34
4.3.3.3. Identificação do gene <i>mecC</i>	34
4.3.3.4. Detecção de <i>S. aureus</i> ST398.....	35
4.3.3.5. Detecção de toxinas.....	35
4.3.4. Caracterização molecular.....	35
4.3.4.1. Tipagem <i>spa</i>	35
4.3.4.2. MLST	36
4.3.4.3. Tipagem <i>SCCmec</i>	37
4.3.4.4. PFGE	38
4.4. Análise estatística.....	39
5. Resultados	39
5.1. Caracterização da amostra populacional.....	39
5.2. Questionário	40
5.3. Frequência de colonização nasal por MRS e caracterização das estirpes	42
5.4. Fatores de risco	46
5.5. Estudo de seguimento	49
6. Discussão.....	54
7. Conclusão e perspetivas futuras	60
8. Bibliografia.....	62
9. Anexos.....	73
Anexo 1 – Resumo aceite para Comunicação Livre (oral) no XXII Congresso Nacional da APMVEAC.....	73
Anexo 2 – Artigo de revisão submetido à revista <i>Medicina Veterinária</i> da AEFMV-ULisboa.....	75
Anexo 3 – Resumo aceite para Comunicação Livre em painel no <i>16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections</i> 2014, Chicago, EUA.....	89
Anexo 4 – Resumo aceite para Comunicação Livre em painel no 24 th <i>European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals Congress</i> 2014, Mainz, Alemanha....	90
Anexo 5 – Resumo aceite para Comunicação Livre no 25 th <i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i> , Copenhaga, Dinamarca	91
Anexo 6 – Questionário entregue aos participantes com instrução escrita relativa à colheita da amostra.....	92
Anexo 7 – Lista de oligonucleótidos utilizados nos vários protocolos de PCR realizados..	94
Anexo 8 – Frequências de resposta às perguntas do questionário feito aos participantes....	96
Anexo 9 – Caracterização molecular das estirpes MR-CoNS por tipagem <i>SCCmec</i>	97

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração esquemática de uma estirpe MRSA SCCmec tipo II (Fonte: IWG-SCC, 2009).....	8
Figura 2 – Ilustração esquemática de estirpe MRSP SCCmec II-III e seu alinhamento com estirpes MRSA SCCmec III e MRSE SCCmec II (Fonte: Descoux et al., 2008).	9
Figura 3 – Diagrama esquemático da relação clonal de ST de <i>S. pseudintermedius</i> . As ST 71, 195 e 203 pertencem ao CC71, as ST 196 e 213 pertencem ao CC196 (Fonte: Couto et al., 2014b).....	13
Figura 4 – Mapa Europeu evidenciando a proporção de isolados invasivos de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA) em 2013 (Fonte: EARS-Net, 2014).....	15
Figura 5 – Aspeto das colónias de staphylococci em MSA (A: <i>S. aureus</i> ; B: <i>S. epidermidis</i>) e em Brilliance™ MRSA2 (C: azuis – MRSA; brancas grandes – MRSH. D: azuis grandes – MRSA; azuis claras pequenas – MRSE). (Fonte: A e B – adaptado da folha do produto; C e D – fotografias originais).....	31
Figura 6 – Multiplex-PCR para identificação do género <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>S. xylosus</i> . M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo <i>S. epidermidis</i> ; 2, controlo positivo <i>S. saprophyticus</i> ; 3, controlo positivo <i>S. xylosus</i> ; 4 e 5, <i>Staphylococcus</i> spp.; 6, <i>S. epidermidis</i> ; 7, controlo negativo (Fonte: fotografia original).	32
Figura 7 – Multiplex-PCR para identificação de <i>S. pseudintermedius</i> , <i>S. schleiferi</i> e <i>S. intermedius</i> . M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo <i>S. pseudintermedius</i> ; 2, controlo positivo <i>S. schleiferi</i> ; 3, controlo positivo <i>S. intermedius</i> ; 4, controlo negativo (Fonte: fotografia original).	33
Figura 8 – Simplex-PCR para identificação de <i>S. haemolyticus</i> . M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1 controlo positivo <i>S. haemolyticus</i> ; 2, <i>S. haemolyticus</i> ; 3, controlo negativo (Fonte: fotografia original).	33
Figura 9 – Multiplex-PCR para identificação de MRSA e <i>S. aureus</i> . M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo MRSA; 2 e 10, MRSE; 3 e 6, <i>S. aureus</i> suscetível à meticilina; 4, 5, 7, 9 e 11, staphylococci coagulase-negativo suscetível à meticilina; 8, MRSP; 12, controlo negativo (Fonte: fotografia original).	34
Figura 10 – M-PCR1 para identificação do complexo do gene <i>ccr</i> . M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder III; 1, controlo positivo SCCmec III; 2, controlo positivo SCCmec IV; 3, controlo positivo SCCmec V; 4, controlo positivo SCCmec VI; 5, 8 e 11, MRSE SCCmec NT (múltiplos tipos <i>ccr</i>); 6, MRSH SCCmec NT (múltiplos tipos <i>ccr</i>); 7, MRSE SCCmec IV; 9, MRSH SCCmec V; 10, MRSH SCCmec NT (tipo <i>ccr</i> não detetável); 12 e 13, MRSE SCCmec IV; 14, MRSE SCCmec NT (tipo <i>ccr</i> não detetável); 15, controlo negativo (Fonte: fotografia original).	38
Figura 11 – Análise de PFGE das estirpes MRSA não ST398 (em cima) e MRSA ST398 (em baixo). ^a T0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^b padrões de PFGE: SA-A ao SA-D.	50
Figura 12 – Análise de PFGE das estirpes MRSP. ^a T0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^b padrões de PFGE: SP-A.	51
Figura 13 – Análise de PFGE das estirpes MRSE. ^a T0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^b padrões de PFGE: SE-A ao SE-G.	52
Figura 14 – Análise de PFGE das estirpes MRSH. ^a T0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^b padrões de PFGE: SH-A ao SH-E.	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classes descritas do complexo do gene <i>mec</i> (Fonte: IWG-SCC, 2009; IWG-SCC, 2013).	7
Tabela 2 – Tipos descritos do complexo do gene <i>ccr</i> (Fonte: IWG-SCC, 2009; IWG-SCC, 2013).	8
Tabela 3 – Exemplo de alguns tipos e subtipos de SCC <i>mec</i> identificados em algumas espécies de CoNS (Fonte: adaptada de Becker et al., 2014b). ^a NT, Não Tipável.....	9
Tabela 4 – Linhagem dos principais clones HA-MRSA e sua distribuição global (Fonte: adaptado de Enright et al., 2002; Stefani et al., 2012). ^a Alelos dos 7 loci na ordem <i>arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL</i>	15
Tabela 5 – Características diferenciadoras dos clones HA-MRSA e CA-MRSA (Fonte: adaptado de Otter & French, 2010; Chen, 2013; Otto, 2013). PVL – Leucocidina de <i>Panton-Valentine</i>	16
Tabela 6 – Principais clones MRSA partilhados pelo Homem e animais (Fonte: adaptado de Pantosti, 2012).	19
Tabela 7 – Resultados possíveis em MSA (Fonte: adaptado da folha do produto).	31
Tabela 8 – Distribuição dos isolados MRS pelos vários grupos profissionais.	42
Tabela 9 – Características das estirpes MRS (n=100) isoladas das 79 pessoas colonizadas... ..	44
Tabela 10 – Análise de fatores de risco para colonização por MRS.....	47
Tabela 11 – Análise agrupada de três variáveis.	48
Tabela 12 – Lista de oligonucleótidos com as respectivas sequências, tamanho de produto e referência.....	94
Tabela 13 – Frequências de resposta às perguntas do questionário.	96
Tabela 14 – Diversidade de SCC <i>mec</i> nas estirpes MR-CoNS (MRSE [n=68], MRSH [n=7] e outros MR-CoNS [n=4]).	97

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da população amostrada (n=129) por grupo profissional.....	39
Gráfico 2 – Distribuição da população amostrada por sexo.	40
Gráfico 3 – Frequência de resposta às perguntas do questionário realizado aos participantes. NR – Não respondeu.	40
Gráfico 4 – Antibióticos tomados pelos participantes nos 6 meses anteriores à entrada no estudo. Nota: alguns participantes indicaram mais do que 1 antibiótico.	40
Gráfico 5 – Antibióticos tomados pelos participantes no ano anterior à entrada no estudo. Nota: alguns participantes indicaram mais do que 1 antibiótico.	41
Gráfico 6 – Animais de estimação referidos pelos participantes. Nota: vários participantes indicaram mais do que 1 animal.	41
Gráfico 7 – Distribuição das espécies de MRS pelos vários grupos profissionais.	42
Gráfico 8 – Espécies de MRS encontradas em co-colonização.	42
Gráfico 9 – Evolução da probabilidade de presença de MRS na análise de seguimento consoante a contagem de UFC/mL (log[1 + UFC]) da primeira análise.	49
Gráfico 10 – Resultado da análise de seguimento.	49

Índice de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

™	Marca registada
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APMVEAC	Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CA-MRSA	Community-acquired/associated MRSA, MRSA associado à comunidade
CC	Complexo Clonal
CoNS	Coagulase-negative staphylococci, Staphylococci coagulase-negativo
CoPS	Coagulase-positive staphylococci, Staphylococci coagulase-positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
E.V.	Enfermagem Veterinária
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EFSA	European Food Safety Agency, Agência Europeia de Segurança Alimentar
EMRSA	Epidemic MRSA clone, clone MRSA epidémico
EUA	Estados Unidos da América
FMV-ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
h	Horas
HA-MRSA	Hospital/healthcare-acquired/associated MRSA, MRSA associado ao ambiente hospitalar
HVL	Hospital Veterinário das Laranjeiras
ID	Identificação das pessoas participantes
IEC	Immune evasion cluster, conjunto de genes responsável por evasão ao sistema imunitário
IgG	Imunoglobulina G
ITU	Infeção do trato urinário
IWG-SCC	International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements
LA-MRSA	Livestock-associated MRSA, MRSA associado a animais de produção
M.V.	Medicina Veterinária
mL	Mililitro
MLST	Multilocus Sequence Typing, Sequenciação de múltiplos <i>loci</i>
mM	Milimolar
MR-CoNS	Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci, Staphylococci coagulase-negativo meticilina-resistente

MR-CoPS	Methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci, Staphylococci coagulase-positivo meticilina-resistente
MRS	Methicillin-resistant staphylococci, staphylococci meticilina-resistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticilina-resistente
MRSH	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> meticilina-resistente
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> meticilina-resistente
MSA	Mannitol Salt Agar, agar manitol com sal
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
n.a.	Não avaliado
n.p.	Não participou
NaCl	Cloreto de Sódio
NCTC	National Collection of Type Cultures, Coleção Nacional de Culturas Tipo
ND	Não Detetável
NR	Não respondeu
NT	Não Tipável
pb	Par de bases
PBS	Phosphate buffered saline, tampão fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction, Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Eletroforese em gel de campo pulsado
PLP	Proteína de ligação à Penicilina
PVL	Panton-Valentine Leukocidin, Leucocidina de <i>Panton-Valentine</i>
RM	Ressonância Magnética
SCC _{mec}	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> , Cassete Cromossomal <i>mec</i> de staphylococci
<i>spa</i>	Staphylococcal Protein A, Proteína A de staphylococci
ST	Sequence Type, Sequência Tipo
T0	Primeira análise
T1	Análise de seguimento
TAC	Tomografia Axial Computadorizada
TE	Tris-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colónias
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Método de Agrupamento pelas Médias Aritméticas Não Ponderadas
USA	United States of America
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

1. PREFÁCIO

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizei o meu estágio curricular no Hospital Veterinário das Laranjeiras (HVL), sob a orientação do Doutor Luís Cruz e co-orientação da Professora Doutora Maria Constança Pomba. O referido estágio teve início a 19 de Agosto de 2013 e término a 31 de Janeiro de 2014, dando-me a oportunidade de estar presente nos vários serviços (medicina interna, internamento e cuidados intensivos, cirurgia e meios complementares de diagnóstico), participar em diversas atividades e acompanhar uma enorme casuística. Na medicina interna, foi-me possível assistir a consultas e auxiliar o médico veterinário em diversos procedimentos, tais como preparação de fármacos orais e injetáveis e sua posterior administração, colocação de cateteres endovenosos, colheita de material biológico para análise, limpeza de feridas, execução de pensos, limpezas auriculares entre outros. A área de internamento foi a que ocupou a maior parte do tempo de estágio, estando a cargo da aluna estagiária a monitorização dos animais internados, administração da terapêutica de acordo com a posologia prescrita, cuidados básicos de higiene, alimentações, passeios, colocação de cateteres endovenosos, fluidoterapia endovenosa e respetivas suplementações, recolha de amostras biológicas para análise e realização de outros exames complementares, algaliação, limpeza de feridas, execução de pensos, preparação e cuidados peri-operatórios e monitorização contínua de pacientes críticos. Na cirurgia, tive a oportunidade de desempenhar variadas tarefas em procedimentos peri-operatórios, tais como, preparação da sala de cirurgia, preparação pré-cirúrgica do animal (colocação de cateter endovenoso, análises sanguíneas pré-cirúrgicas, administração da pré-medicação, tricotomia e desinfeção da área cirúrgica), indução anestésica, entubação do animal, monitorização da anestesia, monitorização durante a recuperação anestésica e pós-operatório imediato. Para além disto, com as consultas de acompanhamento pós-cirúrgico, pude participar na reavaliação das suturas, limpeza das feridas e execução de pensos simples. No HVL existe um laboratório onde é possível realizar análises sanguíneas gerais (hemograma e perfil bioquímico), esfregaços sanguíneos, provas de coagulação, citologias e estudo da urina (tiras de urina, densidade e análise de sedimento), tendo tido a oportunidade de colher variadas amostras biológicas e posteriormente processar e interpretar as mesmas. Tive também a possibilidade de realizar outros exames complementares de diagnóstico, como eletrocardiografia e medição de pressão arterial. No serviço de imagiologia, pude acompanhar a realização de vários exames, como radiografia digital, ecografia (abdominal e cardíaca), endoscopia (digestiva e respiratória). Sempre que, para a execução de determinado exame, era necessário anestesia geral, a aluna estagiária tinha a seu cargo a monitorização da anestesia e monitorização do animal durante a recuperação anestésica. Ao lon-

go do estágio, com a realização de turnos noturnos e aos fins de semana, tive a oportunidade de assistir e participar em consultas e procedimentos de urgência, o que me permitiu compreender melhor e pôr em prática o protocolo ABC (“airway, breathing, circulation”) aprendendo assim a atuar de forma rápida nestas situações. Tive também a possibilidade de participar noutras intervenções tais como hemodiálise e diálise peritoneal, soro subcutâneo, transfusão sanguínea e de plasma, toracocentese e abdominocentese. De uma maneira geral, este estágio, ao possibilitar o contacto com o ambiente real da profissão e atividades realizadas no dia-a-dia da mesma, permitiu-me aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos anteriores na faculdade, a aquisição de novos conhecimentos, o desenvolvimento de raciocínio crítico científico, permitindo ainda o desenvolvimento da capacidade de trabalhar em equipa e de comunicação.

Entre Março e Novembro de 2014, tive a oportunidade de realizar um estágio no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas da FMV-ULisboa, onde participei num projeto de investigação que culminou na escrita desta dissertação. Com este estágio pude executar várias técnicas como extração de ADN, reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese convencional e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Em Maio de 2014, parte dos resultados deste projeto de investigação foram apresentados como comunicação livre (oral) no XXII Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia (APMVEAC) (Anexo 1).

Em Julho, tive a oportunidade de participar na escrita de um artigo de revisão, intitulado “*Staphylococcus pseudintermedius* metilicina-resistente: do diagnóstico ao tratamento”, para a revista *Medicina Veterinária* da Associação dos Estudantes de Medicina Veterinária da FMV-ULisboa (AEFMV-ULisboa) (Anexo 2).

Em Agosto, tive a oportunidade de apresentar alguns dos meus resultados como comunicação livre em painel no *16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections* 2014, Chicago, EUA (Anexo 3).

Em Setembro, este estudo foi apresentado como comunicação livre em painel no *24th European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals Congress* 2014, Mainz, Alemanha (Anexo 4).

Por fim, em Outubro, tive a oportunidade de submeter um trabalho, que já foi aceite, para comunicação livre no *25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Copenhaga, Dinamarca (Anexo 5).

2. INTRODUÇÃO

2.1. Staphylococci

Staphylococci são agentes comensais da pele e membranas mucosas de animais de sangue quente, mas também importantes agentes patogénicos oportunistas de relevância variável (Moodley & Guardabassi, 2009a; Weese & van Duijkeren, 2010; Shore & Coleman, 2013), sendo responsáveis por infeções nosocomiais e infeções adquiridas na comunidade (Gillaspy & Iandolo, 2009; Weese & van Duijkeren, 2010). O género *Staphylococcus*, que compreende 47 espécies e 23 subespécies, pode ser dividido em dois grandes grupos, com base na capacidade de produção da enzima coagulase, em staphylococci coagulase-positivo e staphylococci coagulase-negativo (Weese, 2012; Shore & Coleman, 2013; Becker, Heilmann & Peters, 2014b).

2.1.1. Staphylococci coagulase-positivo (“coagulase-positive staphylococci”, CoPS)

É neste grupo que se encontram as espécies mais virulentas e as mais frequentemente associadas a doença, de que são exemplo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, sendo de referir que as duas primeiras são as mais importantes em Medicina Humana e em Medicina Veterinária, respetivamente (Weese & van Duijkeren, 2010). No entanto a última também é particularmente importante na prática clínica veterinária (Weese, 2012). O leque de doenças provocadas pelos CoPS é vasto e de gravidade variável. De uma maneira geral, as infeções de pele e tecidos moles, como piodermite, impetigo, abscessos, celulite, foliculite e otite, são as manifestações clínicas mais comuns (Weese, 2012). No entanto, *S. aureus* pode também provocar endocardite, bacterémia, sépsis, osteomielite, pneumonia, artrite, infeções pós-cirúrgicas, infeção do trato urinário (ITU), intoxicação alimentar e síndrome de choque tóxico (Gillaspy & Iandolo, 2009; Weese & van Duijkeren, 2010; Weese, 2012). Em Medicina Veterinária, *S. aureus* é também uma importante causa de mastite em bovinos (Feßler, Scott, Kadlec, Ehrlich, Monecke & Schwarz, 2010a; Feßler, Billerbeck, Kadlec & Schwarz, 2010b).

Staphylococcus pseudintermedius é uma nova espécie de CoPS descrita há relativamente pouco tempo em animais (Devriese, Vancanneyt, Baele, Vaneechoutte, De Graef, Snauwaert, Cleenwerck, Dawyndt, Swings, Decostere & Haesebrouck, 2005). Desde 1976 até esta altura, *Staphylococcus intermedius* era considerado o staphylococci mais comum no cão e o principal agente causador de infeções de pele e tecidos moles (Hajek, 1976; Bond & Loeffler, 2012). No entanto, a identificação desta nova espécie permitiu compreender que esta é a espécie mais frequente no cão e a mais frequentemente envolvida em infeção, e não *S. intermedius* como se pensava (Weese & van Duijkeren, 2010; Bond & Loeffler, 2012). Para além de ser a principal

causa de piodermite em cães, *S. pseudintermedius* pode provocar outro tipo de doenças como infeções pós-cirúrgicas, ITU, infeções do trato respiratório, sépsis, artrites/sinovites e peritonites (Ruscher, Lübke-Becker, Wleklinski, Soba, Wieler & Walther, 2009; Kadlec, Schwarz, Perreten, Andersson, Finn, Greko, Moodley, Kania, Frank, Bemis, Franco, Iurescia, Battisti, Duim, Wagenaar, van Duijkeren, Weese, Fitzgerald, Rossano & Guardabassi, 2010; Perreten, Kadlec, Schwarz, Andersson, Finn, Greko, Moodley, Kania, Frank, Bemis, Franco, Iurescia, Battisti, Duim, Wagenaar, van Duijkeren, Weese, Fitzgerald, Rossano & Guardabassi, 2010; Pomba, Couto & Moodley, 2010b). O Homem não é o hospedeiro natural desta espécie, mas pessoas expostas a animais, como os donos e os profissionais veterinários, podem ficar colonizados (Bond & Loeffler, 2012). A importância desta espécie como agente patogénico zoonótico é menor do que a de *S. aureus* (Weese & van Duijkeren, 2010; van Duijkeren, Catry, Greko, Moreno, Pomba, Pyörälä, Ruzaukas, Sanders, Threlfall, Torren-Edo & Törneke, 2011). Contudo, apesar de rara no Homem, já existem alguns casos descritos de infeção, como, por exemplo, bacterémias e infeções associadas a implantes desfibriladores (Van Hoovels, Vankeerberghen, Boel, Van Vaerenbergh & De Beenhouwer, 2006; Chuang, Yang, Hsueh & Lee, 2010; Riegel, Jesel-Morel, Laventie, Boisset, Vandenesch & Prévost, 2011). Na maioria destes casos, a origem da estirpe ou é desconhecida (Van Hoovels et al., 2006) ou sabe-se que a pessoa com infeção teve contacto com cães (Chuang et al., 2010; Riegel et al., 2011), mas como não se pesquisou o agente nos mesmos, não ficou provada uma transmissão zoonótica (van Duijkeren et al., 2011).

2.1.2. Staphylococci coagulase-negativo (“coagulase-negative staphylococci”, CoNS)

A maioria das espécies do género *Staphylococcus* encontra-se neste grupo, sendo frequentemente isoladas como contaminantes em amostras clínicas (Piette & Verschraegen, 2009; Weese, 2012). Contudo, apesar de a coagulase permitir a distinção entre espécies patogénicas e não patogénicas, os CoNS têm sido reconhecidos como agentes etiológicos de uma enorme variedade de infeções (Piette & Verschraegen, 2009). Como exemplos deste grupo temos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus felis*, entre outros; de referir que os primeiros quatro são os mais relevantes no Homem enquanto os dois primeiros e os dois últimos são frequentes nos animais de companhia (Weese, 2012; Faria, Conceição, Miragaia, Bartels, de Lencastre & Westh, 2014; Becker et al., 2014b). As manifestações clínicas de infeções causadas por CoNS são mais subtis, não específicas, frequentemente crónicas e com menor probabilidade de serem fatais comparativamente às de CoPS (Gillaspy & Iandolo, 2009). As infeções surgem mais frequentemente em pacientes imunocomprometidos e/ou

hospitalizados, sendo a bacterémia, infeção do sistema nervoso central, endocardite, ITU, infeção pós-cirúrgica e infeção por corpo estranho (cateter intravenoso, cateter de diálise peritoneal, prótese articular, implante desfibrilhador) as mais comuns (Gillaspy & Iandolo, 2009; Piette & Verschraegen, 2009; Weese, 2012).

Na maioria das vezes não é feita uma identificação de CoNS a nível de espécie, mas tal é necessário para uma melhor compreensão do potencial patogénico das várias espécies deste grupo (Piette & Verschraegen, 2009; Weese, 2012). Alguns CoNS como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* têm surgido como uma importante causa de infeções nosocomiais associadas a dispositivos médicos em Medicina Humana (Gillaspy & Iandolo, 2009; Moodley & Guardabassi, 2009a; Otto, 2009; Becker et al., 2014b). Um importante fator de virulência do *S. epidermidis* é a capacidade de produção de biofilme, permitindo a adesão e permanência de bactérias em dispositivos médicos (cateteres, próteses, entre outros) e proteção contra a ação de antibióticos e do sistema imunitário (Piette & Verschraegen, 2009).

Em Medicina Veterinária, o papel dos CoNS como agentes patogénicos é menos conhecido. No entanto, algumas espécies, como o *S. epidermidis*, o *S. haemolyticus* e *S. hominis*, têm sido isoladas em piodermites, otites, ITU, infeções respiratórias e abscessos de pele em animais de companhia e cavalos (Kern & Perreten, 2013), enquanto nos bovinos, o *S. epidermidis* tem sido identificado em mastites (Feßler et al., 2010b).

2.1.3. Resistência à meticilina – genes *mecA* e *mecC*

Uma característica notável dos staphylococci é a capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, sendo uma das mais importantes a resistência à meticilina. Esta resistência à meticilina é mediada pela presença do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PLP2a ou PLP2'), para a qual os antibióticos β -lactâmicos têm baixa afinidade, surgindo assim resistência a toda esta classe de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos), que é muitas vezes usada como primeira linha em Medicina Veterinária (Weese & van Duijkeren, 2010; Kadlec & Schwarz, 2012; Shore & Coleman, 2013; Becker, Ballhausen, Köck & Kriegeskorte, 2014a). O gene *mecA* está localizado no cromossoma da bactéria num elemento genético móvel designado cassete cromossomal *mec* de staphylococci (“Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”, SCC*mec*) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements [IWG-SCC], 2009; Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a).

Vários estudos já identificaram este gene em várias espécies de staphylococci. A primeira descrição de uma estirpe de *S. aureus* resistente à meticilina (“methicillin-resistant *S. aureus*”, MRSA) ocorreu em 1961 (Barber, 1961; Jevons, 1961) em hospitais de Medicina Humana no

Reino Unido, pouco tempo após a introdução da meticilina (“celbenin”) como agente terapêutico. No campo da Medicina Veterinária, o primeiro isolamento de uma estirpe MRSA foi em 1972 a partir de leite de vacas mastíticas (Devriese, Van Damme & Famaree, 1972). Na Europa, a primeira descrição de MRSA é de 1988 num gato após um surto numa unidade de reabilitação (Scott, Thomson, Malone-Lee & Ridgway, 1988). Em Portugal, já foram identificadas estirpes MRSA em suínos (Pomba, Hasman, Cavaco, da Fonseca & Aarestrup, 2009b), bovinos (Couto, Belas, Centeno, van Duijkeren & Pomba, 2014a), cães e gatos (Coelho, Torres, Radhouani, Pinto, Lozano, Gómez-Sanz, Zaragaza, Igrejas & Poeta, 2011; Couto, Pomba, Moodley & Guardabassi, 2011) e cavalos (Couto, Tilley, Simões, Sales Luís & Pomba, 2012b).

A aquisição do SCCmec por estirpes de *S. pseudintermedius* foi descrita pela primeira vez na Europa em 2007 (Loeffler, Linek, Moodley, Guardabassi, Sung, Winkler, Weiss & Lloyd, 2007). Desde então, estirpes de *S. pseudintermedius* meticilina-resistente (“methicillin-resistant *S. pseudintermedius*”, MRSP) têm sido identificadas em cães, gatos, cavalos e no Homem, quer em colonização quer infeção (Hanselman, Kruth, Rousseau & Weese, 2009; Ruscher et al., 2009; Stegmann, Burnens, Maranta & Perreten, 2010; Savini, Barbarini, Polakowska, Gherardi, Bialecka, Kasproicz, Polilli, Marrollo, Di Bonaventura, Fazii, D’Antonio, Miedzobrodzki & Carretto, 2013). Em Portugal, a primeira descrição de MRSP foi em 2009 num gato com ITU (Pomba et al., 2010b). Após esta primeira descrição, já foram posteriormente caracterizadas 20 estirpes MRSP isoladas de outros tipos de infeções (Couto, Belas, Couto, Perreten & Pomba, 2014b).

No que diz respeito aos CoNS, apesar de possuírem menos fatores de virulência comparativamente aos CoPS, a proporção de estirpes resistentes à meticilina é muito elevada, principalmente em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Becker et al., 2014b). Pouco tempo após a introdução da meticilina, cerca de 10% dos isolados de *S. epidermidis* apresentava resistência à mesma; atualmente, a grande maioria das amostras clínicas de CoNS isolados possui SCCmec (Becker et al., 2014b).

Recentemente, em 2011, foi descrito um gene homólogo ao gene *mecA*, o gene *mecC*, em isolados MRSA de pessoas e bovinos (García-Álvarez, Holden, Lindsay, Webb, Brown, Curran, Walpole, Brooks, Pickard, Teale, Parkhill, Bentley, Edwards, Girvan, Kearns, Pichon, Hill, Larsen, Skov, Peacock, Maskell, & Holmes, 2011; Shore, Deasy, Slickers, Brennan, O’Connell, Monecke, Ehrlich & Coleman, 2011; Ito, Hiramatsu, Tomasz, de Lencastre, Perreten, Holden, Coleman, Goering, Giffard, Skov, Zhang, Westh, O’Brien, Tenover, Oliveira, Boyle-Vavra, Laurent, Kearns, Kreiswirth, Ko, Grundmann, Sollid, John Jr., Daum, Soderquist & Buist, 2012). Posteriormente, este gene (anteriormente designado *mecA*_{LGA251}) já foi

detetado em isolados MRSA de animais de produção, domésticos e selvagens (Paterson, Larsen, Robb, Edwards, Pennycott, Foster, Mot, Hermans, Baert, Peacock, Parkhill, Zadoks & Holmes, 2012), mas apenas na Europa (Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a).

Considerando a recente descoberta deste gene, ele está bastante disseminado entre animais de produção, domésticos e selvagens (Becker et al., 2014a), mas a prevalência em isolados MRSA de humanos é baixa (Shore & Coleman, 2013). Tal situação poderá ser devido a dificuldades na deteção deste gene, pois alguns isolados MRSA com *mecC* apresentam baixas concentrações inibitórias mínimas para a oxacilina e cefoxitina (próximas dos critérios interpretativos, podendo mesmo alguns serem suscetíveis) (Paterson et al., 2012; Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a) e os protocolos de PCR para deteção de *mecA* não detetam este gene, sendo necessário um PCR direcionado para o gene *mecC* (Becker et al., 2014a).

2.1.4. Cassete cromossomal *mec* de staphylococci

Os genes *mecA* e *mecC* estão localizados na SCC*mec*, a qual é constituída por três componentes: complexo do gene *mec*, complexo do gene *ccr* e várias regiões “J” (“Joining regions”) (Figura 1) (IWG-SCC, 2009; Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a). O complexo do gene *mec* compreende o próprio gene *mecA*, os seus genes reguladores *mecRI* e *mecI*, quando presentes, e as sequências de inserção associadas (IWG-SCC, 2009; Shore & Coleman, 2013). Até ao momento, estão descritas 6 classes neste complexo (Tabela 1) (IWG-SCC, 2013).

Tabela 1 – Classes descritas do complexo do gene *mec* (Fonte: IWG-SCC, 2009; IWG-SCC, 2013).

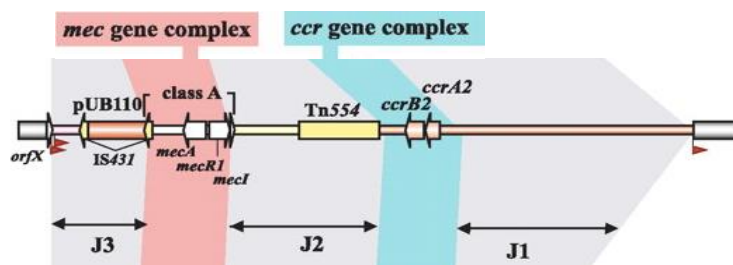
Classes		Tipos de SCC <i>mec</i>
A	IS431- <i>mecA-mecRI-mecI</i>	II, III, VIII
B	IS431- <i>mecA-ΔmecRI</i> -IS1272	I, IV, VI
C1	IS431- <i>mecA-ΔmecRI</i> -IS431 (IS431 na mesma direção)	VII,X
C2	IS431- <i>mecA-ΔmecRI</i> -IS431 (IS431 em direção oposta)	V, IX
D	IS431- <i>mecA-ΔmecRI</i>	
E	<i>blaZ-mecA</i> _{LGA251-} <i>mecRI</i> _{LGA251-} <i>-mecI</i> _{LGA251}	XI

Por sua vez, no complexo do gene *ccr* está o gene *ccr* (“cassette chromosome recombinase”) que codifica uma recombinase da cassete cromossomal, permitindo a integração e excisão do SCC*mec* do genoma dos staphylococci (Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a). Atualmente estão identificados 3 genes *ccr* (*ccrA*, *ccrB* e *ccrC*), com vários alótipos, sendo que o *ccrA* e *ccrB* são adjacentes e presentes no mesmo complexo (Tabela 2) (IWG-SCC, 2009; Shore & Coleman, 2013). Com base nas diferentes combinações de alótipos, estão descritos 8 tipos de complexos do gene *ccr* (Tabela 2) (IWG-SCC, 2013; Shore & Coleman, 2013). A combinação do tipo de complexo de gene *ccr* e a classe de complexo de gene *mec* é utilizada para definir o tipo de SCC*mec* (IWG-SCC, 2009).

Tabela 2 – Tipos descritos do complexo do gene *ccr* (Fonte: IWG-SCC, 2009; IWG-SCC, 2013).

Tipos	Genes <i>ccr</i>	Tipos de SCC <i>mec</i>
1	A1B1	I, IX
2	A2B2	II, IV
3	A3B3	III
4	A4B4	VI, VIII
5	C1	V, VII
6	A5B3	
7	A1B6	X
8	A1B3	XI

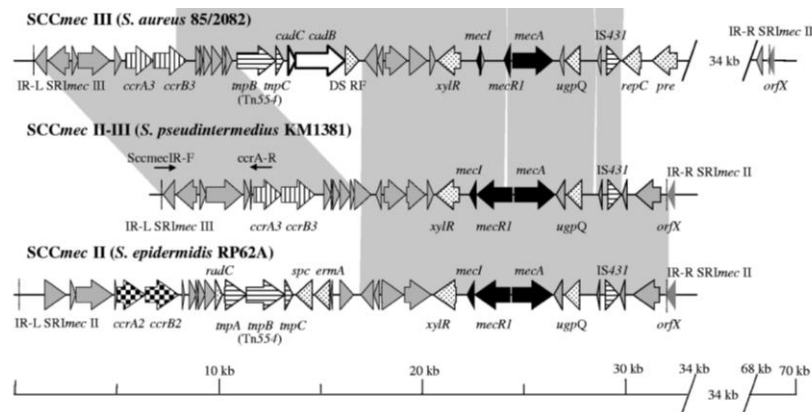
Para além destes dois complexos, SCC*mec* também contém regiões “J” (J1, J2 e J3), que não são essenciais para o seu funcionamento, mas são epidemiologicamente significativas, pois podem ter genes de resistência a antibióticos e metais pesados e genes de virulência adicionais (IWG-SCC, 2009). Estas regiões altamente heterogêneas, variando em comprimento e composição, podem ser utilizadas para definir os subtipos dentro de cada tipo de SCC*mec* (IWG-SCC, 2009).

Figura 1 – Ilustração esquemática de uma estirpe MRSA SCC*mec* tipo II (Fonte: IWG-SCC, 2009).

Até ao momento, estão identificados 11 tipos de SCC*mec* (SCC*mec* I - XI) em estirpes MRSA (IWG-SCC, 2013; Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a). Para além disso, devido à enorme variabilidade das regiões “J”, existe um número crescente de subtipos de SCC*mec*, sendo de referir que as cassetes do tipo II e IV são as que têm mais subtipos (IWG-SCC, 2009). O gene *mecC* tem aparecido em SCC*mec* tipo XI (Becker et al., 2014a).

Nas estirpes MRSP têm sido caracterizados vários tipos de SCC*mec* (SCC*mec* II-III, SCC*mec* III, SCC*mec* IV, SCC*mec* V, SCC*mec* VII e SCC*mec* Não Tipável [NT]) (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010; van Duijkeren et al., 2011), no entanto SCC*mec* II-III e SCC*mec* V são as cassetes predominantes na Europa e América do Norte, respetivamente (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010). De referir que SCC*mec* II-III resulta da combinação de um SCC*mec* II de *S. epidermidis* com um SCC*mec* III de *S. aureus* (Figura 2) (Descloux, Rossano & Perreten, 2008).

Figura 2 – Ilustração esquemática de estirpe MRSP SCCmec II-III e seu alinhamento com estirpes MRSA SCCmec III e MRSE SCCmec II (Fonte: Descoux et al., 2008).



Relativamente aos CoNS, SCCmec é ainda mais prevalente que no MRSA (Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014a). No entanto, não está tão bem definida, sendo frequentemente classificada como NT por: i) não se detetar o tipo de complexo do gene *ccr* e/ou do gene *mec*; ii) existir mais do que um tipo de complexo do gene *ccr* e/ou do gene *mec*; iii) ou detecção de novas combinações entre o tipo de complexo do gene *ccr* e a classe do complexo do gene *mec* que não foram ainda atribuídas a tipos de SCCmec e não existindo atualmente no sistema de classificação (Shore & Coleman, 2013). Dentro das estirpes de staphylococci coagulase-negativo meticilina-resistente (“methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci”, MR-CoNS), tem-se observado uma maior diversidade de SCCmec em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Shore & Coleman, 2013). De uma maneira geral, SCCmec dos tipos III, IV e V são as mais comuns (Tabela 3) (Becker et al., 2014b), sendo que SCCmec tipo IV é o mais frequente em *S. epidermidis*, enquanto em *S. haemolyticus* é o SCCmec tipo V (Lebeaux, Barbier, Angebaul, Benmahdi, Ruppé, Felix, Gaillard, Djossou, Epelboin, Dupont, Renard, Peroz, Vandenesch, Wolff, Andreumont & Ruimy, 2012; Faria et al., 2014).

Tabela 3 – Exemplo de alguns tipos e subtipos de SCCmec identificados em algumas espécies de CoNS (Fonte: adaptada de Becker et al., 2014b). ^aNT, Não Tipável.

Espécie CoNS	Fonte	Tipo e subtipo de SCCmec
<i>S. epidermidis</i>	Homem, gato, cão, cavalo, porco, aves	I, IIa, IIb, III, IV, IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVg, V, VI, NT ^a
<i>S. haemolyticus</i>	Homem, gato, cavalo, porco	I, II, II.1, III, IV, V, NT
<i>S. hominis</i>	Homem, cão, porco	I, III, IV, NT
<i>S. saprophyticus</i>	Homem	III, NT
<i>S. sciuri</i>	Homem, vaca, cabra, ovelha, porco	I, III, IIIA, V, VII, NT

Este elemento SCCmec pode ser transferido horizontalmente entre as várias espécies de staphylococci (Wienders, Vriens, Briesse, de Graaf-Miltenburg, Troelstra, Flier, Schmitz, Verhoef & Fluit, 2001; Kania, Eberlein, Black, Solyman, Ofori, Bemis, 2009; van Duijkeren

et al., 2011), tendo os CoNS um importante papel como reservatórios destes elementos genéticos para espécies de staphylococci clinicamente mais importantes (Becker et al., 2014b).

2.1.5. A problemática da multirresistência em staphylococci

Apesar das estirpes de staphylococci meticilina-resistente (“methicillin-resistant staphylococci”, MRS) não serem necessariamente mais virulentas, provocando o mesmo tipo de infeção que as estirpes meticilina-suscetíveis, o problema reside nas poucas opções terapêuticas disponíveis (van Duijkeren et al., 2011; Weese, 2012). Isto porque, como referido anteriormente, *SCCmec* pode conter outros importantes genes de resistência (IWG-SCC, 2013), surgindo assim uma co-resistência a outras classes de antibióticos comumente utilizadas. Já foram identificadas estirpes de MRS com resistência a fluoroquinolonas (enrofloxacin, marbofloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin e pradofloxacin), aminoglicosídeos (gentamicin, amikacin, kanamicin, tobramycin, streptomycin), macrólidos (erythromycin), lincosamidas (clindamicin e lincomycin), inibidores dos canais de folato (trimetoprim/sulfamethoxazole), tetraciclins, rifampicin e cloranfenicol (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010; Paul, Modley, Ghibaud & Guardabassi, 2011; Couto et al., 2011; Lebeaux et al., 2012; Weiß, Kadlec, Feßler & Schwarz, 2013; Faria et al., 2014). Esta situação é particularmente preocupante em estirpes MRSP dado existirem estudos que indicam que estas são resistentes a muitas mais classes de antibióticos que as estirpes MRSA (Paul et al., 2011; Couto et al., 2011), tornando o tratamento das infeções provocadas por MRSP um enorme desafio terapêutico.

2.1.6. Métodos epidemiológicos de tipagem

Os métodos de tipagem para caracterização e discriminação de isolados, com base nas características fenotípicas e genotípicas, que permitem estabelecer relações clonais entre as estirpes e a disseminação geográfica de clones, são importantes ferramentas epidemiológicas (Faria, Carriço, Oliveira, Ramirez & de Lencastre, 2008; Sabat, Budimir, Nashev, Sá-Leão, van Dijk, Laurent, Grundmann, Friedrich, 2013).

Os métodos de tipagem tradicionais baseados nas características fenotípicas, como características das colónias, reações bioquímicas e teste de suscetibilidade a antibióticos, têm sido utilizados desde há bastante tempo (Sabat et al., 2013). Contudo, os métodos moleculares, por permitirem, de uma maneira geral, uma melhor discriminação entre isolados comparativamente aos testes fenotípicos, são os mais utilizados atualmente (Faria et al., 2008). Os métodos moleculares mais utilizados em MRS são a eletroforese em gel de campo pulsado, sequenciação de múltiplos *loci*, tipagem *spa* e tipagem *SCCmec*.

2.1.6.1. Eletroforese em gel de campo pulsado

A eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, PFGE) tem sido considerada o “gold standard” para a caracterização das estirpes, principalmente em situações de surtos (Faria et al., 2008; Sabat et al., 2013). Com recurso a enzimas de restrição, o ADN cromossomal é clivado e os fragmentos de ADN resultantes (normalmente de grandes dimensões) são separados num gel de agarose por eletroforese de campo pulsado, em que a direção do campo elétrico ao longo do gel muda periodicamente (Sabat et al., 2013). Os fragmentos de ADN separados podem ser visualizados como bandas no gel, formando um padrão de macrorestrição de ADN bacteriano (Sabat et al., 2013). Os vários perfis de macrorestrição são comparados uns com os outros para determinar a relação ou clonalidade das estirpes (Tenover, Arbeit, Goering, Mickelsen, Murray, Persing & Swaminathan, 1995). As grandes vantagens desta técnica são o grande poder discriminatório entre estirpes, sendo bastante útil na investigação de surtos, e permite analisar uma grande porção do ADN genómico (>90%) (Sabat et al., 2013). As desvantagens estão relacionadas com o facto de ser uma técnica laboriosa e demorada (Sabat et al., 2013). Problemas relacionados com a dificuldade de comparação de resultados entre laboratórios, por existirem diferentes protocolos, foram ultrapassados com a elaboração de um protocolo consenso de PFGE para tipagem de estirpes MRSA, facilitando, não só a comparação de resultados entre laboratórios, mas também a monitorização da dispersão de estirpes epidémicas pela Europa (Murchan, Kaufmann, Deplano, de Ryck, Struelens, Zinn, Fussing, Salmenlinna, Vuopio-Varkila, Solh, Cuny, Witte, Tassios, Legakis, van Leeuwen, van Belkum, Vindel, Laconcha, Garaizar, Haeggman, Olsson-Liljequist, Ransjo, Coombes & Cookson, 2003). Este protocolo, com algumas alterações, também tem sido utilizado para a tipagem de estirpes MRSP e MR-CoNS (Kadlec et al., 2010; Perrreten et al., 2010).

2.1.6.2. Sequenciação de múltiplos *loci*

A sequenciação de múltiplos *loci* (“multilocus sequence typing”, MLST) é uma técnica que foi desenvolvida para superar a reduzida portabilidade e dificuldade de comparação de resultados entre laboratórios por parte das técnicas moleculares tradicionais (Enright, Day, Davies, Peacock & Spratt, 2000; Sabat et al., 2013). Neste método, os fragmentos nucleotídicos internos de sete genes altamente conservados (genes “housekeeping”) no genoma da bactéria são amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciados (Faria et al., 2008; Sabat et al., 2013). Posteriormente, para cada locus, a sequência obtida é comparada com todas as sequências previamente identificadas, sendo atribuído um número (alelo) (Enright et al., 2000; Sabat et al., 2013). A combinação dos 7 alelos (perfil alélico) permite a determina-

ção da sequência tipo (“Sequence Type”, ST) (Enright et al., 2000; Sabat et al., 2013). As grandes vantagens deste método são a existência de uma nomenclatura internacional padrão, elevada reprodutibilidade e existência de uma base de dados acessível *online* com as sequências alélicas e perfis ST (Enright et al., 2000; Faria et al., 2008; Sabat et al., 2013). Contudo tem um custo elevado, é laboriosa e demorada (Sabat et al., 2013).

O protocolo de MLST para o *S. aureus* foi desenvolvido em 2000, tendo sido escolhidos os seguintes genes conservados (“housekeeping”): carbamato cinase (*arcC*), chiquimato desidrogenase (*aroE*), glicerol cinase (*glpF*), guanilato cinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*) (Enright et al., 2000). Os dados epidemiológicos de vários isolados de *S. aureus* podem ser consultados na sua base de dados de MLST (<http://saureus.mlst.net/>).

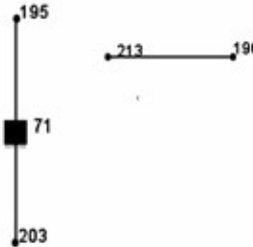
O primeiro protocolo de MLST desenvolvido para o *S. pseudintermedius* envolvia a sequenciação de 5 *loci* (Bannoehr, Zakour, Waller, Guardabassi, Thoday, van den Broek & Fitzgerald, 2007). Contudo, recentemente, este esquema foi expandido a 7 *loci* para aumentar o poder discriminatório desta técnica (Solyman, Black, Duim, Perreten, van Duijkeren, Wagenaar, Eberlein, Sadeghi, Videla, Bemis & Kania, 2013). Os genes *housekeeping* sequenciados são os seguintes: 16S rRNA (gene codificante da subunidade 16S do RNA ribossomal), *cpn60* (chaperonina 60), *tuf* (fator de alongamento da cadeia peptídica Tu), *pta* (fosfato acetiltransferase), *agrD* (proteína reguladora da comunicação interbacteriana), *purA* (adenilosuccinato sintetase), *fdh* (formato desidrogenase), *ack* (acetato cinase) e *sar* (co-transportador de sulfato de sódio) (Bannoehr et al., 2007; Solyman et al., 2013). A base de dados de MLST de *S. pseudintermedius* está disponível em <http://pubmlst.org/spseudintermedius/>.

No que diz respeito aos CoNS, o esquema de MLST atualmente utilizado para o *S. epidermidis* foi adaptado de 3 protocolos, pois separadamente estes não tinham um bom poder discriminatórios dos isolados, tendo sido selecionados os 7 *loci* mais discriminatórios (Thomas, Vargas, Miragaia, Peacock, Archer & Enright, 2007). A base de dados de MLST de *S. epidermidis* está disponível em <http://sepidermidis.mlst.net/>. Recentemente foram desenvolvidos esquemas de MLST para *S. haemolyticus* (Cavanagh, Klingenberg, Hanssen, Fredheim, François, Schrenzel, Flaegstad & Sollid, 2012) e *S. hominis* (Zhang, Thomas, Miragaia, Bouchami, Chaves, d’Azevedo, Aanensen, de Lencastre, Gray & Robinson, 2013). No entanto, só existe base de dados para *S. hominis* (<http://shominis.mlst.net/>) (Zhang et al., 2013).

Na base de dados de MLST está disponível o algoritmo eBURST (“Based upon related sequence type”) que permite analisar a relação genética entre as ST, agrupando-as em Complexos Clonais (“Clonal complex”, CC) (Figura 3). Em cada CC são incluídas ST que apresen-

tem alelos idênticos em, pelo menos, 5 dos 7 *loci* (Enright, Robinson, Randle, Feil, Grundmann & Spratt, 2002).

Figura 3 – Diagrama esquemático da relação clonal de ST de *S. pseudintermedius*. As ST 71, 195 e 203 pertencem ao CC71, as ST 196 e 213 pertencem ao CC196 (Fonte: Couto et al., 2014b).



Atualmente, de forma a facilitar a identificação dos clones de MRS, os mesmos são definidos pela combinação do tipo de *SCCmec* e pela ST (definida por MLST); por exemplo, o clone EMRSA-15 é definido como ST22-*SCCmec* IV ou, abreviado, ST22-IV (Enright et al., 2002; IWG-SCC, 2009). Esta nomenclatura pode também incluir o tipo *spa*.

2.1.6.3. Tipagem *spa*

Esta técnica (“spa typing”) consiste em sequenciar a região polimórfica X do gene da proteína A de *S. aureus* (“Staphylococcal protein A”, *spa*) (Shopsin, Gomez, Montgomery, Smith, Waddington, Dodge, Bost, Riehman, Naidich & Kreiswirth 1999; Sabat et al., 2013). A proteína A é uma proteína de superfície capaz de se ligar à porção Fc da imunoglobulina G (IgG) e, ao impedir a opsonização, diminui a fagocitose das células bacterianas por parte do sistema imunitário do hospedeiro (Weese, 2012). A região polimórfica X consiste num número variável de repetições de 24 pares de bases (pb) e o elevado grau de diversidade genética resulta de mutações pontuais, deleção e duplicação de repetições (Shopsin et al., 1999; Sabat et al., 2013). Neste método, a cada repetição identificada é atribuído um código, sendo o tipo *spa* deduzido a partir do número e ordem específica das repetições (Sabat et al., 2013). Para além do grande poder discriminatório, a tipagem *spa* tem outras grandes vantagens como rapidez, facilidade de realização, nomenclatura padrão internacional e disponibilidade de um *software* sincronizado com uma base de dados acessível *online* – Ridom web server (<http://spaserver.ridom.de/>) (Sabat et al., 2013). Em relação à técnica de MLST, a tipagem *spa* é mais discriminatória e barata, pois envolve a sequenciação de um único *locus* (Faria et al., 2008).

A tipagem *spa* também pode ser realizada em estirpes de *S. pseudintermedius*, tendo o protocolo sido desenvolvido por Moodley, Stegger, Zakour, Fitzgerald & Guardabassi (2009b). Contudo, alguns autores referem a existência de estirpes não tipáveis por este protocolo, devi-

do à produção de múltiplas bandas inespecíficas que complicam a sequenciação (Moodley et al., 2009b; Perreten et al., 2010). Posteriormente descobriu-se que essas múltiplas bandas inespecíficas estão relacionadas com a presença de dois genes *spa* adjacentes, mas o significado biológico desta duplicação não é conhecido (Perreten et al., 2010). Para além disso, uma possível desvantagem desta técnica está relacionada com a atribuição do mesmo tipo *spa* em isolados que, por outros métodos moleculares (MLST e PFGE), não estão relacionados (Perreten et al., 2010).

2.1.6.4. Tipagem SCCmec

A determinação das estruturas do SCCmec e sua classificação em tipos pode ser obtida através de PCR. Existem vários protocolos de PCR que têm como alvo múltiplos *loci* na cassette para um maior poder discriminatório. Um exemplo é o protocolo desenvolvido por Kondo e colegas (2007), que compreende 6 multiplex-PCR (M-PCR): o M-PCR 1 é dirigido para amplificação do complexo do gene *ccr*, tendo um controlo interno (amplificação do gene *mecA*); o M-PCR 2 é dirigido para amplificação do complexo do gene *mec*; e M-PCR 3 ao 6 são dirigidos para estruturas específicas na região “J” (Kondo, Ito, Ma, Watanabe, Kreiswirth, Etienne & Hiramatsu, 2007). A grande vantagem deste método é a flexibilidade, pois não detecta um tipo particular de cassette, mas *loci* cruciais, permitindo no final ter o tipo de SCCmec. Contudo, a aplicação destes 6 M-PCR de forma rotineira é difícil, tendo, por isso mesmo, os autores sugerido, numa primeira fase, a realização dos M-PCR 1 e 2 para determinar o tipo de SCCmec e, caso se pretenda mais informação, realizar os restantes para determinar os subtipos de cassette (Kondo et al., 2007)

2.1.7. Clones predominantes de MRS no Mundo e Portugal

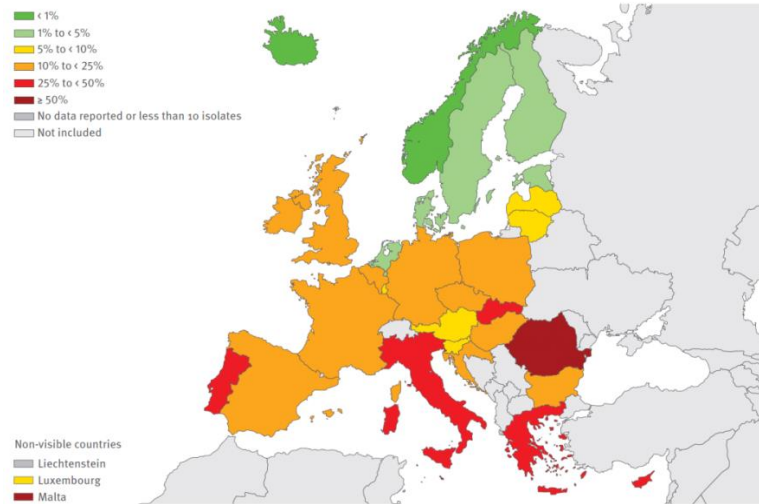
2.1.7.1. MRSA

2.1.7.1.1. MRSA associado ao Hospital

Nos anos seguintes à identificação do primeiro caso de infeção por MRSA, este agente disseminou-se globalmente, tendo-se tornado altamente prevalente nos hospitais pelo mundo inteiro (Stefani, Chung, Lindsay, Friedrich, Kearns, Westh & MacKenzie, 2012). De uma maneira geral, as maiores prevalências (> 50%) de MRSA verificam-se na América do Norte e do Sul e Ásia enquanto prevalências intermédias (25-50%) na Austrália, China e África (Stefani et al., 2012). Na Europa, existe uma enorme variabilidade na prevalência (0-64.5%) de MRSA entre países (Figura 4): na região sul e sudeste (por exemplo Portugal, Itália, Grécia, Malta e Roménia) as taxas geralmente são mais elevadas enquanto no norte (por exemplo Holanda,

Suécia, Noruega e Dinamarca) são mais baixas (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network [EARS-Net], 2014).

Figura 4 – Mapa Europeu evidenciando a proporção de isolados invasivos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em 2013 (Fonte: EARS-Net, 2014).



Estas infeções por MRSA estiveram, durante muito tempo, limitadas ao ambiente hospitalar (“hospital/healthcare-acquired/associated MRSA”, HA-MRSA), ocorrendo sobretudo em pacientes com fatores de risco, como período de hospitalização prolongado, antibioterapia prolongada, intervenções cirúrgicas, pacientes com sistema imunitário debilitado e/ou contacto com pessoas positivas para MRSA (Catry, van Duijkeren, Pomba, Greko, Moreno, Pyörälä, Ruzauskas, Sanders, Threlfall, Ungemach, Törneke, Munoz-Maduro & Torren-Edo, 2010; Otto, 2013). Apenas um pequeno número de clones teve sucesso neste ambiente (Stefani et al., 2012). Os principais clones HA-MRSA pertencem ao CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 (Tabela 4) (Enright et al., 2002; Stefani et al., 2012).

Tabela 4 – Linhagem dos principais clones HA-MRSA e sua distribuição global (Fonte: adaptado de Enright et al., 2002; Stefani et al., 2012). ^aAlelos dos 7 loci na ordem *arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL*.

CC	ST	Perfil alélico ^a	Designação anterior do clone	Distribuição global
5	ST5-I	1-4-1-4-12-1-10	UK-EMRSA-3	Europa, América do Sul
	ST5-II	1-4-1-4-12-1-10	Nova Iorque/Japão, USA100	EUA, Japão, Canadá, Coreia do Sul, Austrália, Europa
	ST5-IV	1-4-1-4-12-1-10	USA800, Clone Pediátrico	EUA, América do Sul, Europa
	ST5-VI	1-4-1-4-12-1-10	Clone Pediátrico (Portugal)	Europa
	ST228-I	1-4-1-4-12-24-29	Italiano/Alemão do Sul	Europa
8	ST8-IV	3-3-1-1-4-4-3	UK-EMRSA-2/6, USA500	Canadá, EUA, Europa, Austrália
	ST239-III	2-3-1-1-4-4-3	Brasileiro, Português, UK-EMRSA-1/4/11	Ásia, Austrália, África do Sul, América do Sul, Europa
	ST247-I	3-3-1-12-4-4-16	Ibérico, Romano, UK-EMRSA-5/17	EUA, Europa
22	ST22-IV	7-6-1-5-8-8-6	UK-EMRSA-15	Europa, Austrália, Canadá

CC	ST	Perfil alélico ^a	Designação anterior do clone	Distribuição global
30	ST36-II	2-2-2-2-3-3-2	UK-EMRSA-16, USA200	EUA, Reino Unido, Austrália, Canadá
	ST45-II	10-14-8-6-10-3-2	USA600	EUA
45	ST45-IV	10-14-8-6-10-3-2	Berlim	Europa

A distribuição destes clones varia geograficamente (Stefani et al., 2012). Por exemplo, os clones HA-MRSA dominantes nos Estados Unidos da América (EUA) são o ST5-II (USA100), ST5-IV (USA800) e ST8-IV (USA500), no Reino Unido são o ST22-IV (EMRSA-15) e ST36-II (EMRSA-16), na Alemanha o CC5 e ST45-IV, enquanto na América do Sul, Austrália e Ásia é o ST239-III (Stefani et al., 2012). De uma maneira geral, os clones do CC5 e CC8 são os mais prevalentes a nível mundial, sendo que o CC22 também se encontra bastante disseminado (Stefani et al., 2012).

2.1.7.1.2. MRSA associado à comunidade

Nos últimos anos, têm surgido infeções por MRSA em pessoas jovens saudáveis, da comunidade, sem os fatores de risco típicos associados às infeções nosocomiais (Otto, 2013). As estirpes responsáveis por este tipo de infeção são fenotipicamente e genotipicamente distintas das estirpes HA-MRSA, tendo recebido a designação de MRSA associado à comunidade (“community-acquired/associated MRSA”, CA-MRSA) (Otter & French, 2010; Otto, 2013). Existem várias definições para CA-MRSA, mas uma globalmente aceite consiste no isolamento de estirpes de MRSA num paciente de consulta externa ou nas primeiras 48h após admissão no hospital; tal paciente não pode ter história de colonização ou infeção anterior por MRSA, hospitalização, procedimentos cirúrgicos ou diálise no último ano, e não pode ter também cateteres (Otter & French, 2010; Chen, 2013). Os grupos de risco para CA-MRSA incluem crianças, prisioneiros, militares, atletas e pessoas em centros de dia, ou seja, populações e áreas de concentração onde o risco de infeção cruzada é elevado (Cattray et al., 2010; Stefani et al., 2012). A Tabela 5 resume as principais diferenças entre os clones HA-MRSA e CA-MRSA.

Tabela 5 – Características diferenciadoras dos clones HA-MRSA e CA-MRSA (Fonte: adaptado de Otter & French, 2010; Chen, 2013; Otto, 2013). PVL – Leucocidina de *Panton-Valentine*.

Característica	HA-MRSA	CA-MRSA
Manifestações clínicas mais comuns	Bacterémias, pneumonias, infeções pós-cirúrgicas	Infeções de pele e tecidos moles, pneumonia necrotizante
Perfil de resistência a antibióticos	Resistente a muitos antibióticos	Suscetível a muitos antibióticos (que não β -lactâmicos)
Tipo de cassette	SCCmec I, II e III	SCCmec IV e V
Outras		Maior virulência (por exemplo, PVL)

De referir que a Leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) é uma citotoxina que provoca destruição leucocitária, com efeitos pró-inflamatórios resultando em lesão tissular (Otter & French, 2010; Otto, 2013). É um importante fator de virulência associado a pneumonias necrotizantes graves, contudo, nem todos os clones CA-MRSA o possuem, não sendo um marcador universal destes clones (Otter & French, 2010).

Os clones CA-MRSA são geneticamente mais diversos, pertencendo a uma enorme variedade de CC, sendo de referir que alguns pertencem a CC onde também estão clones HA-MRSA (Concord, 2013). À semelhança do verificado com os clones nosocomiais, os clones CA-MRSA também estão associados a localizações geográficas específicas. Nos EUA, o clone CA-MRSA predominante é ST8-IV (PVL positivo [+]) (USA300), na Austrália são os clones ST1-IV (PVL negativo), ST30-IV (PVL+) (clone do Pacífico Sudoeste) e ST93-IV (PVL+), na Ásia é o clone ST30-IV (PVL+), enquanto na Europa existe uma maior diversidade clonal, havendo contudo predominância do clone ST80-IV (PVL+) (clone Europeu) (Otter & French, 2010; Chen, 2013; Otto, 2013). Uma questão preocupante é que estes clones CA-MRSA têm aumentado a um ritmo alarmante e alcançaram países em que as infeções por clones HA-MRSA estão controladas, como Dinamarca e Holanda (Concord, 2013).

Apesar de, tipicamente, os clones HA-MRSA e CA-MRSA se encontrarem, respetivamente, no ambiente hospitalar e na comunidade, eles não estão exclusivamente limitados a esses espaços, pois alguns clones CA-MRSA têm-se infiltrado e estabelecido nos hospitais, sendo uma causa frequente de infeções nosocomiais (Otter & French, 2011). Por sua vez, os clones HA-MRSA têm-se disseminado para a comunidade, podendo causar infeção (Espadinha, Faria, Miragaia, Lito, Melo-Cristino, de Lencastre & Médicos Sentinela Network, 2013). Esta disseminação de clones entre estes dois ambientes pode levar a um esbatimento das características diferenciadoras entre ambos.

2.1.7.1.3. MRSA em animais

O MRSA também se estabeleceu em diferentes espécies animais (Weese, 2010). Vários estudos epidemiológicos em animais de companhia encontraram clones de MRSA indistinguíveis dos clones humanos (Moodley, Stegger, Bagcigil, Baptiste, Loeffler, Lloyd, Williams, Leonard, Abbott, Skov & Guardabassi, 2006; Hanselman et al., 2009; Pomba, Hasman, Cavaco, Couto & Aarestrup, 2009a; Ishihara, Shimokubo, Sakagami, Ueno, Muramatsu, Kadosawa, Yanagisawa, Hanaki, Nakajima, Suzuki & Tamura, 2010; Couto et al., 2011; Wedley, Dawson, Maddox, Coyne, Pinchbeck, Clegg, Jamrozy, Fielder, Donovan, Nuttall & Williams, 2014), sendo que as estirpes encontradas tendem a ser as que predominam no Homem em determinada região (Weese & van Duijkeren, 2010; Pantosti, 2012). Por exemplo, Moodley e

colegas (2006) verificaram que a maioria das estirpes MRSA detetadas em cães e gatos correspondiam ao clone EMRSA-15, o qual é, como referido anteriormente, um dos clones predominantes nos hospitais de Medicina Humana no Reino Unido. Estes resultados sugerem que a presença de MRSA nos animais de companhia é por contacto próximo com o Homem, ou seja, uma “humanose” (Catry et al., 2010; Weese, 2010; Weese & van Duijkeren, 2010).

Nos equinos, as estirpes identificadas frequentemente pertencem à ST8 e outras ST dentro do CC8 (Moodley et al., 2006; Weese, 2010; Weese & van Duijkeren, 2010). Um clone típico dos equinos é o USA500, que surgiu como um importante clone HA-MRSA nos EUA apesar de ser responsável por uma pequena percentagem de infeções no Homem (Weese, 2010; Weese & van Duijkeren, 2010). A predominância deste clone epidémico humano em equinos sugere que o mesmo se terá adaptado a esta espécie animal (Weese & van Duijkeren, 2010). Para além deste, o clone epidémico ST5 também já foi identificado em cavalos (Couto et al., 2012b).

Recentemente, nos animais de produção, sobretudo suínos, surgiu uma nova estirpe MRSA com potencial zoonótico, tendo sido designada de MRSA associado a animais de produção (“livestock-associated MRSA”, LA-MRSA) (Pantosti, 2012). Este LA-MRSA não tem uma definição exata, sendo definido com base em dados epidemiológicos e genéticos, como o tipo de SCCmec presente e o facto de ser isolado de animais, veterinários e pessoas que vivem e trabalham em explorações (Concord, 2013). Estas estirpes LA-MRSA têm algumas características típicas: i) resistência à clivagem pela enzima de restrição *Sma*I (enzima de restrição normalmente usada para tipagem de *S. aureus* por PFGE), tendo por isso mesmo sido classificadas, inicialmente, como não tipáveis por PFGE; ii) pertencem sobretudo ao CC398, sendo a ST398 a mais frequentemente identificada; iii) têm SCCmec do tipo IV ou V, sendo este último o mais frequente; e iv) a maioria das estirpes não têm toxinas, como a PVL (Pantosti, 2012). Um estudo realizado pela Agência Europeia de Segurança Alimentar (“European Food Safety Agency”, EFSA) para averiguar a prevalência de MRSA em suiniculturas, detectou este agente na maioria dos países Europeus (17 de 24 participantes), tendo também verificado que países com maior densidade de explorações tinham maiores prevalências de MRSA (EFSA, 2009). Para além da Europa, estas estirpes LA-MRSA foram também detetadas em suínos no Canada e EUA (Khanna, Friendship, Dewey & Weese, 2008; Smith, Gebreyes, Abley, Harper, Forshey, Male, Martin, Molla, Sreevatsan, Thakur, Thiruvengadam & Davies, 2013). Apesar da predominância destas estirpes em suínos, têm sido detectados outros clones, como por exemplo o clone epidémico humano USA100 no Canadá e os clones ST1/CC1, ST5/CC5, ST8/CC8, ST9/CC9, ST30 e ST39 ambas do CC30, ST97/CC97 e ST132/CC133 na Europa (Khanna et al., 2008; EFSA, 2009; Pomba et al., 2009b; Weese & van Duijkeren,

2010). O clone LA-MRSA CC398 já foi detetado noutras espécies, como cães (Nienhoff, Kadlec, Chaberny, Verspohl, Gerlach, Schwarz, Simon & Nolte, 2009), gatos (Weiß et al., 2013), cavalos (Couto et al., 2012b), bovinos (Feßler et al., 2010a) e Homem (principalmente em pessoas com contato próximo com suínos, como veterinários e trabalhadores nas explorações) (Nienhoff et al., 2009; Feßler et al., 2010a; Smith et al., 2013). Nos bovinos, para além do MRSA ST398, também têm sido detetados alguns clones humanos em mastites, como ST239-III e ST8-IV (PVL negativo) (Türkyilmaz, Tekbiyık, Oryasin & Bozdogan, 2010).

Atualmente sabe-se que o LA-MRSA CC398 teve origem no Homem como *S. aureus* meticilina-suscetível, tendo-se disseminado, posteriormente, para os animais de produção, onde adquiriu resistência à meticilina e tetraciclinas e perdeu o fago que contém os genes responsáveis por evasão ao sistema imunitário (“immune evasion cluster”, IEC) (cruciais na adaptação ao hospedeiro humano) (Price, Stegger, Hasman, Aziz, Larsen, Andersen, Pearson, Waters, Foster, Schupp, Gillece, Driebe, Liu, Springer, Zdovc, Battisti, Franco, Zmudzki, Schwarz, Butaye, Jouy, Pomba, Porrero, Ruimy, Smith, Robinson, Weese, Arriola, Yu, Laurent, Keim, Skov & Aarestrup, 2012). Os dados sugerem que esta passagem do Homem para os animais foi acompanhada por uma diminuição da capacidade de colonização, transmissão e virulência, nesse hospedeiro, contudo este clone tem sido identificado em infeções humanas (Price et al., 2012). Um estudo realizado em 17 países Europeus, em 2007, verificou que LA-MRSA ST398 correspondia apenas a uma pequena percentagem (0-25%) de isolados MRSA de infeções humanas e que dependia da distribuição regional de animais de produção (van Cleef, Monnet, Voss, Krziwanek, Allerberger, Struelens, Zemlickova, Skov, Vuopio-Varkila, Cuny, Friedrich, Spiliopoulou, Pászti, Hardardottir, Rossney, Pan, Pantosti, Borg, Grundmann, Mueller-Premru, Olsson-Liljequist, Widmer, Harbarth, Schweiger, Unal & Kluytmans, 2011). Os países com maior proporção de isolados ST398 foram a Holanda (11.9-25%) e a Bélgica (4.7%), enquanto nos restantes a proporção foi inferior a 2% (van Cleef et al., 2011).

De uma maneira geral, as estirpes de MRSA identificadas em animais de companhia e cavalos são diferentes das obtidas de animais de produção. Em animais de companhia e cavalos, as estirpes são normalmente similares aos clones MRSA humanos, enquanto nos animais de produção as estirpes parecem pertencer a clones específicos adaptados aos animais (Tabela 6) (Pantosti, 2012).

Tabela 6 – Principais clones MRSA partilhados pelo Homem e animais (Fonte: adaptado de Pantosti, 2012).

CC	ST	Animais de companhia	Equinos	Suínos	Aves	Bovinos	Homem
1	ST1			✓		✓	✓
5	ST5 (USA100)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	ST8 (USA500)		✓				✓
	ST254		✓				

CC	ST	Animais de companhia	Equinos	Suínos	Aves	Bovinos	Homem
9	ST9		✓	✓			
22	ST22 (EMRSA-15)	✓					✓
30	ST36 (EMRSA-16)	✓					✓
97	ST97			✓			✓
130	ST130					✓	✓
398	ST398	✓	✓	✓	✓	✓	✓

2.1.7.1.4. MRSA em Portugal

Em Portugal, a prevalência de MRSA (46.8%) em pacientes humanos em ambiente hospitalar continua a ser uma das mais elevadas da Europa (Figura 4), apesar de ter diminuído ligeiramente em relação aos anos anteriores (EARS-Net, 2014). Desde o início de 1990 que existe uma vigilância nacional a nível hospitalar, permitindo compreender que, ao longo dos anos, tem havido uma substituição dos clones predominantes: i) em 1992 e 1993, o clone Português (ST239-III) foi substituído pelo clone Ibérico (ST247-IA); ii) em 1994 e 1995 surgiu o clone Brasileiro (ST239-III/IIIA) que, desde então, se disseminou rapidamente; iii) em 2001, o clone EMRSA-15 (ST22-IV) surgiu em Portugal, tendo rapidamente substituído o clone anterior; e iv) em 2006 verificou-se uma dominância massiva do clone EMRSA-15 (54%) em coexistência com os clones Nova Iorque/Japão (17%) e Brasileiro (17%) (Aires-de-Sousa, Correia, de Lencastre & Multilaboratory Project Collaborators, 2008). Um estudo que avaliou a evolução de MRSA num hospital em dois momentos temporais (1993 e 2010) também verificou esta substituição clonal: em 1993, circulavam no hospital o clone Ibérico (ST247-I) e Português (ST239-III) que, em 2010, foram substituídos pelo clone EMRSA-15 (ST22-IVh) (72% dos isolados nosocomiais) (Espadinha et al., 2013). Para além disso, o segundo clone mais frequente foi o clone relacionado ao Nova Iorque/Japão (ST105-II), seguido do clone relacionado ao Pediátrico (ST125-IVc) e o clone Pediátrico (ST5-IVc); estes três clones pertencem ao CC5 (correspondendo a 20% dos isolados) (Espadinha et al., 2013). Aires-de-Sousa e colegas (2008), considerando a evolução clonal observada no seu estudo, referiram que o clone Nova Iorque/Japão seria, provavelmente, o próximo clone emergente em Portugal, contudo no estudo de Espadinha e colegas (2013) esse papel parece ter sido ocupado pelos seus clones relacionados, o ST105-II e ST125-IVc. Caso o clone relacionado ao Nova Iorque/Japão (ST105-II) se torne predominante em Portugal, poderemos ter de enfrentar um problema ainda mais grave num futuro próximo: a emergência de estirpes MRSA resistentes à vancomicina (“Vancomycin-resistant *S. aureus*”, VRSA). Isto porque recentemente surgiu o primeiro caso de infeção por VRSA em Portugal, tendo a estirpe de *S. aureus* sido identificada como ST105-t002-II com os genes *mecA* e *vanA* (Melo-Cristino, Resina, Manuel, Lito & Ramirez, 2013). Após a identificação desta estirpe VRSA, foi realizado um estudo epidemiológico para

averiguar uma possível disseminação da mesma, não tendo sido detetada em nenhuma das pessoas que tinham contactado com a pessoa com infeção (Friães, Resina, Manuel, Lito, Ramirez & Melo-Cristino, 2014). Além do mais, a presença do VRSA esteve apenas limitada ao local de infeção, não tendo sido detetada em colonização noutros locais (Friães et al., 2014). À semelhança da maioria dos isolados VRSA encontrados nos EUA, o VRSA isolado em Portugal pertencia ao CC5, suportando a hipótese de que as estirpes do CC5 são mais propensas a adquirir elementos genéticos contendo o gene *vanA* a partir de estirpes de enterococci resistentes à vancomicina (Friães et al., 2014).

Considerando a situação problemática nos hospitais Portugueses, têm sido realizados vários estudos para avaliar a extensão de disseminação do MRSA e identificar os principais clones circulantes na comunidade. Estudos iniciais revelaram que a prevalência de colonização por MRSA na nasofaringe de crianças e na cavidade nasal de recrutas militares, estudantes universitários e de secundário era extremamente baixa (<1%) (Sá-Leão, Sanches, Couto, Alves & de Lencastre, 2001; Tavares, Sá-Leão, Miragaia & de Lencastre, 2010). Para além disso, têm sido reportados apenas casos esporádicos de infeção por clones CA-MRSA (Europeu e USA300) em Portugal (Conceição, Aires-de-Sousa, Pona, Brito, Barradas, Coelho, Sardinha, Sancho, de Sousa, Machado & de Lencastre, 2011; Nazareth, Gonçalves-Pereira, Tavares, Miragaia, de Lencastre, Silvestre, Freitas, Gonçalves, Martins, Mendes, Tapadinhas & Póvoa, 2012). Contudo, um estudo mais recente mostra uma realidade bem diferente, ou seja, foi encontrada uma elevada frequência de MRSA (114 em 527; 21,6%) na comunidade (Tavares, Miragaia, Rolo, Coelho, de Lencastre & CA-MRSA/MSSA working group, 2013). No entanto, apenas 11,4% desses isolados correspondia aos clones epidémicos CA-MRSA típicos (USA300, USA400, USA700, Europeu, Pacífico Sudoeste e ST398) (Tavares et al., 2013). A grande maioria (88,6%) pertencia a clones epidémicos HA-MRSA, nomeadamente ao clone EMRSA-15 (ST22-IV) e Nova Iorque/Japão ou clones relacionados a este (ST5-II, ST105-II) (Tavares et al., 2013). Também Espadinha e colegas (2013), ao avaliar a população de MRSA causadora de infeções de pele e tecidos moles na comunidade, verificaram que mais de metade dos isolados MRSA pertencia aos clones hospitalares predominantes (ST22-IV, ST5-IV e ST105-II). Estes resultados sugerem a ocorrência de uma disseminação dos clones HA-MRSA típicos para a comunidade (Espadinha et al., 2013; Tavares et al., 2013). Recentemente, estudos realizados em autocarros públicos no Porto e em Lisboa verificaram que os mesmos estavam frequentemente contaminados por clones HA-MRSA, nomeadamente EMRSA-15, constituindo, assim, um importante reservatório destes clones na comunidade (Simões, Aires-de-Sousa, Conceição, Antunes, da Costa & de Lencastre, 2011; Conceição, Diamantino, Coelho, de Lencastre & Aires-de-Sousa, 2013). O clone EMRSA-15 também foi o mais fre-

quentemente encontrado como agente de colonização em profissionais de saúde (Amorim, Vasconcelos, Oliveira, Azevedo, Calado, Faria, Pereira, Castro, Moreira, Aires, Cabeda, Ramos, Amorim & de Lencastre, 2009). No que diz respeito aos animais, estirpes MRSA pertencentes aos CC5 e CC22 já foram identificados em piodermites e ITU em pequenos animais (Pomba et al., 2009a; Couto, Belas & Pomba, 2012a) e o clone EMRSA-15, responsável por uma infeção de pele numa cadela, foi também identificado no Médico Veterinário que a acompanhava (Pomba et al., 2009a). O LA-MRSA CC398 foi identificado num surto de epidermite exsudativa em três explorações suinícolas em Portugal, tendo também sido identificado no Médico Veterinário e em trabalhadores das mesmas (Pomba, Baptista, Couto, Loução & Hasman, 2010a). Em Portugal, a prevalência de estirpes MRSA em animais saudáveis situa-se nos 1,4% em gatos, 2% em bovinos e 3% em cavalos (Couto et al., 2011; Couto et al., 2012b; Couto et al., 2014a). Em cães, um estudo realizado em Lisboa encontrou uma prevalência de 0.7% (Couto et al., 2011), mas num outro estudo, realizado no Norte, foi encontrada uma prevalência de 29.6% (Coelho et al., 2011). As estirpes encontradas nos animais de companhia correspondem ao principal clone HA-MRSA em Portugal, o EMRSA-15, e eram todas multirresistentes (Couto et al., 2011; Coelho et al., 2011). Em cavalos, suínos e bovinos, o principal clone identificado em colonização foi o LA-MRSA ST398 (Pomba et al., 2009b; Couto et al., 2012b; Couto et al., 2014a). No entanto também se identificou o clone CC5 nos cavalos e CC30 em suínos (Pomba et al., 2009b; Couto et al., 2012b).

2.1.7.2. MRSP

À semelhança do verificado para o MRSA, apenas um número limitado de clones MRSP está disseminado mundialmente com um padrão geográfico bastante específico. Bannoehr e colegas (2007), ao investigar 89 isolados de *S. pseudintermedius* de diferentes espécies animais de diferentes países da Europa e EUA, encontraram 61 ST diferentes, revelando uma considerável diversidade clonal. Contudo os isolados MRSP pertenciam apenas a 5 ST distintas (ST29, ST68, ST69, ST70 e ST71), sugerindo que o gene *mecA* tinha sido adquirido múltiplas vezes por diferentes clones (Bannoehr et al., 2007). Para além disso, ST idênticas ou estreitamente relacionadas tinham sido identificadas em vários países, indicando uma disseminação global de alguns clones (Bannoehr et al., 2007). De referir ainda que os isolados de *S. pseudintermedius* de origem humana tinham ST idênticas ou relacionadas às dos isolados comensais de origem canina, sugerindo que as infeções humanas ocorrem por transmissão zoonótica a partir de um hospedeiro canino (Bannoehr et al., 2007). Recentemente, um estudo multicêntrico sobre isolados MRSP de origem canina obtidos de vários países Europeus, dos EUA e Canadá, permitiu verificar que duas linhagens clonais de MRSP principais se encontram dissemi-

nadas na Europa e EUA (Perreten et al., 2010). A linhagem clonal ST71-t02(*spa*)-II-III encontra-se altamente disseminada em vários países Europeus e, ocasionalmente, é detetada em cães da América do Norte; por sua vez, nesta região, a linhagem clonal predominante é ST68-t06-V (Perreten et al., 2010). Independentemente da origem e distribuição geográficas, estes isolados apresentavam resistência às principais classes de antibióticos usados em Medicina Veterinária (Perreten et al., 2010). De modo similar, Ruscher e colegas (2010), ao analisar isolados MRSP de várias espécies animais, observaram uma maior predominância do clone MRSP ST71 multirresistente em vários países Europeus, tendo também identificado este clone em gatos e cavalos (Ruscher, Lübke-Becker, Semmler, Wleklinski, Paasch, Soba, Stamm, Kopp, Wieler & Walther, 2010). Um estudo multicêntrico, similar ao realizado em cães por Perreten e colegas (2010), foi realizado em gatos (Kadlec, Schwarz, Perreten, Andersson, Finn, Greko, Moodley, Kania, Frank, Bemis, Franco, Iurescia, Battisti, Duim, Wagenaar, van Duijkeren, Weese, Fitzgerald, Rossano & Guardabassi, 2010). Os isolados MRSP Europeus de origem felina, apesar de serem de diferentes origens geográficas, foram identificados como ST71-t02-II-III, apresentando resistência a mais do que 3 classes de antibióticos, enquanto um isolado do Canadá foi identificado como ST100-t23-V, sendo apenas resistente aos β -lactâmicos e tetraciclina (Kadlec et al., 2010). Uma comparação dos resultados obtidos em ambos os estudos multicêntricos permitiu verificar que o MRSP felino de origem canadiana era diferente em todas as características (exceto no tipo de SCC*mec*) do clone canino dominante na América do Norte (ST68-t06-V) (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010). Por sua vez, a maioria dos isolados MRSP felinos Europeus, para além das mesmas características, tinham o mesmo padrão de PFGE (J) que a linhagem clonal dominante de MRSP nos cães na Europa, sugerindo uma troca de isolados MRSP entre cães e gatos na Europa (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010). Este clone MRSP Europeu multirresistente (ST71-t02-J-II-III) já foi também identificado como causador de infeção no Homem (Stegmann et al., 2010).

Em Portugal, após a primeira identificação de uma estirpe MRSP num gato com ITU (Pomba et al., 2010b), este agente já foi isolado em otites, infeções de pele e pós-cirúrgicas em animais de companhia (Couto et al., 2014b). As estirpes MRSP isoladas nestas infeções e estirpes de colonização foram recentemente caracterizadas (Couto et al., 2014b). A prevalência de colonização por MRSP foi de 6.2% em cães, não tendo sido detetado em gatos saudáveis; o clone predominante foi o ST71, mas o ST68 também foi identificado (Couto et al., 2011). A maioria das estirpes de infeção foi identificada como ST71-II-III, tendo sido também identificadas novas ST (ST196 e ST213) (Couto et al., 2014b). À semelhança do observado noutros estudos (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010) todas as estirpes MRSP tinham um padrão de multirresistência (Couto et al., 2014b). Devido a este padrão de multirresistência frequen-

temente observado e as poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infeções, o recurso a terapêuticas tópicas, nomeadamente preparações antissépticas, tem ganho interesse (Couto et al., 2014b). Como tal, Couto e colegas (2014b) avaliaram também a suscetibilidade a vários biocidas, como o acetato de clorohexidina e triclosan, tendo verificado que estes são clinicamente eficazes e uma opção terapêutica tópica segura.

2.1.7.3. MR-CoNS

No que diz respeito aos MR-CoNS, nomeadamente *S. epidermidis* meticilina-resistente (“methicillin-resistant *S. epidermidis*”, MRSE) e *S. haemolyticus* meticilina-resistente (“methicillin-resistant *S. haemolyticus*”, MRSH), o método de tipagem molecular mais utilizado para os caracterizar é a técnica de PFGE (Miragaia, Couto, Pereira, Kristinsson, Westh, Jarlöv, Carriço, Almeida, Santos-Sanches & de Lencastre, 2002; Miragaia, Thomas, Couto, Enright & de Lencastre, 2007; Cavanagh et al., 2012). Miragaia e colegas (2002) analisaram 230 isolados MRSE, de infeção e colonização, de vários hospitais da Dinamarca e Islândia e, posteriormente compararam os perfis de macrorestrição de PFGE destes isolados com os perfis de macrorestrição de isolados MRSE de países da América do Norte, América do Sul, Europa e África de modo a determinar a disseminação geográfica de clones MRSE. Com este estudo, observaram uma considerável diversidade genética e que existiam estirpes MRSE provenientes de diferentes países com grupos/tipos clonais de PFGE comuns, sugerindo uma disseminação geográfica destas estirpes entre os vários países (Miragaia et al., 2002). Para além disso, como os isolados da Dinamarca e Islândia foram obtidos em 2 anos consecutivos nos mesmos hospitais, Miragaia e colegas (2002) verificaram que alguns isolados MRSE tinham o mesmo tipo e subtipo de PFGE, sugerindo que estas estirpes MRSE são endémicas em ambiente hospitalar. Com o desenvolvimento de um protocolo MLST para *S. epidermidis* (Thomas et al., 2007), uma coleção geograficamente diversa e representativa de isolados nosocomiais de *S. epidermidis* foi analisada, tendo sido identificadas 74 ST diferentes, confirmando a enorme diversidade genética observada noutros estudos (Miragaia et al., 2007). Contudo, estas ST foram agrupadas num CC principal (CC2), oito CC menores e várias ST únicas, sendo que o CC2 compreendia 39 ST e a maioria dos isolados analisados no estudo (Miragaia et al., 2007). Das 74 ST identificadas na coleção, 22 continham estirpes provenientes de vários países, sendo que a ST2 era a mais disseminada, pois foi identificada em isolados de 13 países num total de 17 analisados (Miragaia et al., 2007). De referir ainda que 16 ST tinham simultaneamente isolados de colonização e infeção e o SCC_{mec} IV foi o predominante em toda a coleção (Miragaia et al., 2007). Também na Austrália se verificou a ocorrência, persistência e potencial disseminação de um clone MRSE multirresistente responsável por infeções nosocomiais (Wi-

derström, McCullough, Coombs, Monsen & Christiansen, 2012). Esse clone pertencia à ST2, tendo sido identificado na maioria dos isolados (Widerström et al., 2012). Neste estudo, foram ainda identificados dois tipos de SCCmec, tipo III e IV, tendo o último sido o predominante (Widerström et al., 2012). No que diz respeito ao MRSH, a presença de clones endémicos em ambiente hospitalar e a disseminação de clones nosocomiais já foi observada (Bouchami, Ben Hassen, de Lencastre & Miragaia, 2012). De modo a determinar a estrutura populacional e possível emergência de clones MRSH nosocomiais, foi desenvolvido um protocolo MLST para *S. haemolyticus*, contudo não teve resultados satisfatórios (Cavanagh et al., 2012), não existindo ainda uma base de dados mundial acessível aos investigadores.

Em Medicina Veterinária também têm sido descritos casos de infeção por MR-CoNS, nomeadamente em animais de companhia, equinos e bovinos (Feßler et al., 2010b; Kern & Perreten, 2013). Os MR-CoNS identificados em infeção em animais de companhia e cavalos, nos últimos anos, foram analisados por Kern & Perreten (2013). As espécies identificadas neste estudo correspondiam às mesmas responsáveis por infeções nosocomiais no Homem, com predominância de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Kern & Perreten, 2013). A análise de PFGE revelou que a maioria dos isolados era geneticamente diversa, no entanto entre os isolados MRSE foram identificadas 3 linhagens clonais predominantes, com perfis de PFGE similares, que pertenciam ao CC2, CC5 e CC22 (Kern & Perreten, 2013). A ST2, a ST nosocomial mais amplamente disseminada pelo mundo inteiro (Miragaia et al., 2007; Widerström et al., 2012), foi também a predominante neste estudo (Kern & Perreten, 2013). O MRSH foi o segundo mais frequentemente encontrado neste estudo, contudo a ausência de um protocolo MLST com bom poder discriminatório para *S. haemolyticus* não permitiu determinar se existe uma ST predominante nos animais e se corresponde às ST mais encontradas no Homem (Kern & Perreten, 2013). Contudo, a existência de diferentes perfis PFGE parece indicar que os clones de MR-CoNS associados a infeção nos animais são muito heterogéneos (Kern & Perreten, 2013). Para além da resistência aos β -lactâmicos, a maioria dos isolados era também resistente às fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas e aminoglicosídeos (Kern & Perreten, 2013). Tal como no MRSA e MRSP, o tratamento das infeções por MR-CoNS está a tornar-se um desafio terapêutico pela frequente multirresistência (Kern & Perreten, 2013). OS CoNS também têm vindo a ser isolados com frequência em mastites bovinas (Feßler et al., 2010b). Em 121 isolados de CoNS de mastites, apenas 15 eram *mecA* positivos, sendo os mais frequentes o MRSE e MRSH (Feßler et al., 2010b). Recentemente foi feita uma análise comparativa de isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* de pessoas, animais de companhia e cavalos (McManus, Coleman, Deasy, Brennan, Connell, Monecke, Ehricht, Leggett & Shore, 2014). A maioria destes isolados tinha *mecA*, tendo o SCCmec IV sido o tipo predominante entre os

MRSE de humanos, animais de companhia e cavalos, enquanto o SCCmec V foi o predominante em MRSH de animais (McManus et al., 2014). Foram identificados, em ambos os hospedeiros, isolados com a mesma ST na população de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, indicando que estas espécies de staphylococci podem ser transmitidas entre humanos, animais de companhia e cavalos (McManus et al., 2014).

Em Portugal, uma comparação da população de *S. epidermidis* presente no ambiente hospitalar e na comunidade mostrou que ambas as populações têm uma elevada diversidade genética, contudo a grande maioria dos isolados encontrados em ambos os ambientes pertencia ao CC5 (anteriormente designado CC2) (Rolo, Miragaia & de Lencastre, 2012). Este clone já tinha sido previamente descrito como o mais prevalente em ambiente hospitalar (Miragaia et al., 2007; Widerström et al., 2012), mas o facto de também ter sido o predominante na comunidade neste estudo sugere uma adaptação a ambientes com características diferentes (Rolo et al., 2012). No que diz respeito aos animais de companhia, os MR-CoNS também têm sido identificados em infeção; uma análise comparativa, por PFGE e MLST, de MRSE e MRSH de infeção em animais com isolados humanos de colonização permitiu identificar tipos clonais de PFGE simultaneamente isolados em animais e humanos (Couto, Rodrigues, Belas, Marques & Pomba, resumo aceite; Anexo 5). Para além disso, as linhagens clonais de MRSE ST5 e ST35 (ambas do CC5) foram identificadas tanto em humanos e animais, sugerindo uma transmissão entre estes hospedeiros (Couto et al., resumo aceite; Anexo 5). Também em bovinos têm sido identificados e caracterizados MR-CoNS em mastites clínicas e subclínicas (Seixas, Santos, Bexiga, Vilela & Oliveira, 2014).

2.2. Situação atual da colonização por MRS na comunidade Médico-Veterinária

Com a emergência de estirpes MRS como importantes agentes patogénicos em Medicina Veterinária, existem vários estudos sobre prevalência de colonização por estes agentes em animais. No que diz respeito aos profissionais médico-veterinários, também têm sido realizados vários estudos de colonização por MRSA e MRSP (Anderson, Lefebvre & Weese, 2008; Moodley, Nightingale, Stegger, Nielsen, Skov & Guardabassi, 2008; Ishihara et al., 2010; Jordan, Simon, Fury, Moss, Giffard, Maiwald, Southwell, Barton, Axon, Morris & Trott, 2011; Paul et al., 2011; Garcia-Graells, Antoine, Larsen, Catry, Skov & Denis, 2012; Wettstein Rosenkranz, Rothenanger, Brodard, Collaud, Overesch, Bigler, Marschall & Perreten, 2014). De uma maneira geral, estes estudos identificaram taxas de colonização elevadas, sugerindo que a colonização dos profissionais veterinários por MRS é por exposição ocupacional, constituindo um grupo de risco (Anderson et al., 2008; Moodley et al., 2008; Ishihara et al., 2010; Jordan et al., 2011; Paul et al., 2011; Garcia-Graells et al., 2012; Wettstein Rosenkranz et al., 2014).

Para além disso, as estirpes encontradas nos profissionais veterinários tendem a ser as mais frequentes nos animais com que contactam (Moodley et al., 2008; Ishihara et al., 2010; Paul et al., 2011; Wettstein Rosenkranz et al., 2014). A prevalência de colonização por MR-CoNS em pessoas em contacto com cavalos (como veterinários) também pode ser elevada (63%), tendo também sido identificados, por PFGE, clones de MRSH e *Staphylococcus vitulinus* meticilina-resistente que eram partilhados entre cavalos e pessoas na mesma quinta ou ambiente hospitalar, sugerindo uma possível transmissão inter-espécie, quer diretamente ou através de um ambiente contaminado (Moodley & Guardabassi, 2009a). Alguns estudos têm investigado a presença de fatores de risco para colonização na comunidade médico-veterinária. Tratar um cavalo diagnosticado com MRSA ou ter sido pessoalmente diagnosticado com MRSA no último ano (Anderson et al., 2008); e contactar com animais de companhia, cavalos e bovinos, mas não com suínos (Moodley et al., 2008) foram identificados como fatores de risco para colonização por MRSA. No entanto, num outro estudo, o contacto com animais de produção, nomeadamente suínos, foi identificado como um importante fator de risco para colonização por LA-MRSA ST398 em veterinários e produtores (Garcia-Graells et al., 2012). Ishihara e colegas (2010) verificaram que os trabalhadores de um hospital veterinário (médicos, enfermeiros e auxiliares veterinários) tinham uma incidência de colonização por MRSA significativamente maior que os estudantes ($p < 0.01$) e o contacto com um animal positivo para MRSA foi identificado como fator de risco para colonização por MRSA e MRSP. Um resultado interessante do estudo de Anderson e colegas (2008) foi a identificação da higienização regular das mãos como um importante fator protetor, demonstrando a importância desta e de outras medidas nos programas de prevenção e controlo de infeção.

Como referido anteriormente, estudos realizados noutros países indicam que os profissionais médico-veterinários são um grupo de risco particular, mas em Portugal não se sabe qual a prevalência de colonização, nem quais as espécies mais frequentes de MRS. Contudo, clones responsáveis por infeção em animais já foram detetados nos veterinários que contactavam com esses animais, sugerindo transmissão zoonótica (Pomba et al., 2009a; Pomba et al., 2010a).

2.3. Padrão de Colonização

De uma maneira geral, nos estudos existentes, a colonização por MRS é determinada num ponto temporal com uma única zaragatoa nasal dos participantes, podendo não refletir o seu estado de colonização real. No entanto, alguns estudos longitudinais com recolha de várias zaragatoas ao longo do tempo têm sugerido 3 tipos de padrão de colonização: colonização persistente, intermitente e ausência de colonização (Sollid, Furberg, Hanssen & Johannessen,

2014), sobretudo no caso de *S. aureus* (Nouwen, Ott, Kluytmans-Vandenberg, Boelens, Hofman, van Belkum & Verbrugh, 2004; van Belkum, Verkaik, de Vogel, Boelens, Verveer, Nouwen, Verbrugh & Wertheim, 2009). Contudo, não existe um consenso no que diz respeito à definição de cada um destes padrões de colonização. Nouwen e colegas (2004) desenvolveram e testaram um procedimento (“culture rule”) capaz de diferenciar entre pessoas colonizadas persistentemente de pessoas colonizadas de forma intermitente ou não colonizadas com um número mínimo de culturas de zaragatoas nasais e tendo em conta os resultados qualitativo e quantitativo dessas culturas. Assim, a partir de 2 zaragatoas nasais obtidas com uma semana de intervalo é possível definir as pessoas como persistentemente colonizadas (2 culturas positivas para *S. aureus*), intermitentemente colonizadas (1 cultura positiva para *S. aureus*) e não colonizadas (sem culturas positivas para *S. aureus*) (Nouwen et al., 2004). É importante também referir que as pessoas identificadas como persistentemente colonizadas tinham uma maior contagem bacteriana e, portanto, maior carga bacteriana na cavidade nasal que as pessoas colonizadas de forma intermitente (Nouwen et al., 2004). Posteriormente, van Belkum e colegas (2009) sugeriram uma reclassificação dos tipos de colonização em 2: colonização persistente e outros tipos. Esta proposta tem por base os resultados obtidos no estudo de colonização nasal artificial dos mesmos, em que 51 voluntários, com um padrão de colonização conhecido, foram descolonizados e inoculados com uma mistura de estirpes de *S. aureus*, tendo comparado o tempo de sobrevivência intranasal das estirpes de *S. aureus* (van Belkum et al., 2009). van Belkum e colegas (2009) verificaram que o tempo de sobrevivência do *S. aureus* após inoculação intranasal era muito maior para as pessoas colonizadas persistentemente (> 154 dias) do que para as pessoas com colonização intermitente (14 dias) ou sem colonização (4 dias) e que a carga bacteriana e o título de anticorpos anti-estafilococos eram significativamente maiores na colonização persistente, sugerindo assim que esta constituía uma categoria separada da colonização intermitente e ausência de colonização. Para além disso, como estas duas últimas tinham respostas semelhantes à inoculação intranasal de *S. aureus* e títulos de anticorpos anti-estafilococos semelhantes poderiam ser agrupadas numa só categoria (van Belkum et al., 2009). Contudo, estes estudos foram baseados apenas nos resultados das culturas, não nos permitindo saber se realmente estas pessoas mantiveram a colonização pelo mesmo clone ou se eventualmente houve uma re-colonização por outro clone de *S. aureus*. Não existem muitos dados relativamente à persistência de colonização por MRS. No entanto, recentemente, Paul e colegas (2011) avaliaram a frequência de colonização nasal por *S. aureus* e *S. pseudintermedius* em dermatologistas veterinários de pequenos animais com um estudo de seguimento aos participantes positivos para MRSA e MRSP. Em 128 participantes, 2 foram positivos para MRSA (1,6%) e 5 para MRSP (3,9%) (Paul et al., 2011). Destes, ape-

nas 1 veterinário com MRSA e 2 com MRSP aceitaram participar no estudo de seguimento, realizado 1 mês depois da primeira colheita, tendo-se verificado que as estirpes identificadas na primeira e segunda colheitas tinham o mesmo tipo de *spa*, indicando uma potencial colonização a longo prazo destes agentes (Paul et al., 2011).

No que diz respeito aos CoNS, Lebeaux e colegas (2012) realizaram um estudo que pretendia avaliar a evolução de colonização nasal por MR-CoNS numa comunidade fechada, tendo aplicado critérios de classificação do padrão de colonização bastante diferentes. Isto é, as pessoas foram consideradas como não estando colonizadas se não identificassem MR-CoNS em 2006 e 2008, colonizadas de forma persistente se fosse isolado pelo menos um MR-CoNS em 2006 e 2008 e intermitentemente colonizadas se estes agentes fossem isolados em 2006 ou 2008 (Lebeaux et al., 2012). Assim, das 154 pessoas participantes, 42 (27.3%), 39 (25.3%) e 73 (47.4%) foram consideradas não colonizadas, persistentemente colonizadas e intermitentemente colonizadas, respetivamente (Lebeaux et al., 2012). Relativamente às espécies de staphylococci encontradas nas pessoas persistentemente colonizadas, a mais frequente foi *S. epidermidis* (12/154 pessoas) seguida de *S. haemolyticus* (3/154) e *S. hominis* (3/154), contudo, com base no tipo de SCCmec e perfil de susceptibilidade a antibióticos não β -lactâmicos, nenhuma das pessoas tinha o mesmo clone em ambos os anos (Lebeaux et al., 2012).

3. OBJETIVOS

Este projeto de investigação foi desenvolvido no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas na FMV-ULisboa, nos meses de Março a Novembro de 2014. Teve como principal objetivo determinar a frequência de colonização por MRS em portadores humanos saudáveis que, devido à sua profissão, podem contactar com animais colonizados/infetados por estes agentes patogénicos e que, por isso, são considerados um grupo de risco, não esquecendo que simultaneamente são também reservatório dos mesmos. Um segundo e terceiro objetivos passaram pela identificação de fatores de risco para colonização e por perceber se os indivíduos colonizados por MRS apresentavam uma colonização transitória ou prolongada. Para a realização destes objetivos foi definido um protocolo semelhante ao aplicado em estudos anteriores (Paul et al., 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra populacional

Durante os meses de Março a Agosto de 2014 vários profissionais de hospitais e clínicas veterinárias da cidade de Lisboa foram contactados para participar, de forma voluntária, neste

estudo. Assim, foram incluídos na amostra populacional médicos veterinários, enfermeiros veterinários, auxiliares e estudantes de medicina veterinária e de enfermagem veterinária. Durante a realização do XXII Congresso Nacional da APMVEAC foram também colhidas amostras, de forma voluntária, aos participantes.

4.2. Recolha das amostras e questionário

A cada participante foi entregue um breve questionário para obtenção de informação essencial, como profissão, sexo e idade, mas também informação sobre fatores de risco reconhecidos para a colonização por estes agentes, como uso de antibióticos nos últimos 6 meses e no último ano, infeção de pele nos últimos 6 meses, presença de alguma doença crónica, hospitalização e cirurgia prévias. Posteriormente procedeu-se à colheita da amostra que consistia numa zaragatoa nasal, tendo sido fornecido aos participantes uma instrução escrita sobre como a realizar (Anexo 6).

As pessoas em que foram identificados MRS na zaragatoa nasal, foram contactadas cerca de 1 a 4 meses depois da primeira análise para fornecerem uma segunda zaragatoa nasal no sentido de avaliar se a colonização era transitória ou prolongada.

4.3. Isolamento bacteriano e caracterização

4.3.1. Isolamento

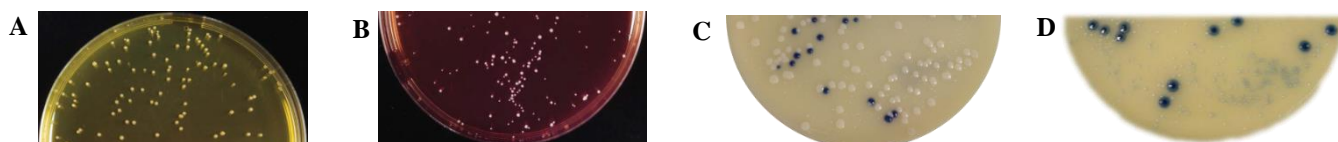
As zaragatoas nasais foram colocadas em tubos com 1 mL de NaCl 0,85% e foi feita uma passagem pelo agitador para assegurar a libertação das bactérias para o líquido. Posteriormente realizou-se uma sementeira por esgotamento de 100 µL desta solução em agar manitol com sal (Biokar Diagnostics, França) e em agar Brilliance™ MRSA2 (Oxoid, UK), tendo sido ambos incubados a 37°C durante 24h e 48h. Para cada placa foi feita uma avaliação qualitativa, baseada na presença ou ausência de crescimento, e uma avaliação quantitativa total (UFC/mL) às 24h e às 48h.

Em agar manitol com sal (“Mannitol Salt Agar”, MSA), segundo as instruções do fabricante, foram consideradas possíveis colónias de staphylococci, as colónias amarelas com halo amarelo e as colónias rosa com halo vermelho (Tabela 7 e Figura 5). O agar Brilliance™ MRSA2, apesar de direcionado para a identificação rápida de MRSA (aparecendo colónias azuis), também permite o desenvolvimento de outros MRS, aparecendo colónias azuis claras, brancas ou rosas (Figura 5). Posteriormente procedeu-se ao isolamento das possíveis colónias de staphylococci que aparecessem em ambos os meios, para agar sangue, para posterior extração de ácido desoxirribonucleico (“deoxyribonucleic acid”, ADN).

Tabela 7 – Resultados possíveis em MSA (Fonte: adaptado da folha do produto).

Microrganismo	Resultado de crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colónias amarelas rodeadas por halo amarelo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colónias rosa envolvidas por uma zona vermelha
<i>Escherichia coli</i>	Nenhum crescimento
<i>Enterococcus faecalis</i>	Nenhum crescimento

Figura 5 – Aspeto das colónias de staphylococci em MSA (A: *S. aureus*; B: *S. epidermidis*) e em Brilliance™ MRSA2 (C: azuis – MRSA; brancas grandes – MRSH. D: azuis grandes – MRSA; azuis claras pequenas – MRSE). (Fonte: A e B – adaptado da folha do produto; C e D – fotografias originais).



4.3.2. Extração de ADN

Para a realização deste procedimento foi utilizado um protocolo adaptado do protocolo descrito pelo Laboratório de Referência em Resistência Antimicrobiana da União Europeia (<http://www.crl-ar.eu>). Este protocolo para extração de ADN por fervura em bactérias de Gram positivo consistiu em suspender, com o auxílio de uma ansa, cultura da bactéria em tampão fosfato salino (“Phosphate buffered saline”, PBS) num tubo de centrifugação de 1,5 mL. Após uma breve passagem pelo agitador, a amostra foi centrifugada durante 5 minutos, tendo-se, posteriormente, descartado o sobrenadante e ressuspendido o sedimento em Tris-EDTA (TE) (10 mM:1 mM). A seguir, a amostra foi fervida em banho-maria, a aproximadamente 100°C, durante 10 minutos, tendo sido, posteriormente, transferida para o congelador durante 1 minuto. Por fim, o lisado foi diluído 10 vezes em TE (10:1) e armazenado no congelador, a uma temperatura de -20°C.

4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”, PCR)

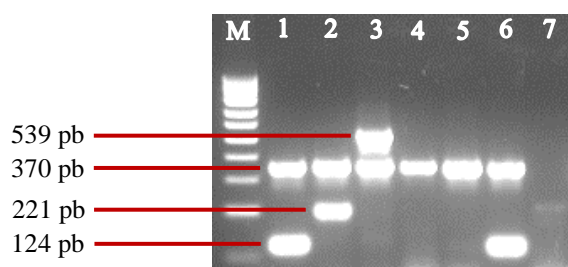
Esta foi a técnica escolhida para proceder à amplificação de genes de interesse, permitindo a identificação das espécies e de genes de resistência, tendo-se posteriormente realizado uma eletroforese para deteção dos respetivos produtos de PCR. A lista de oligonucleótidos utilizados nos vários PCR realizados encontra-se na Tabela 12 no Anexo 7.

4.3.3.1. Confirmação do género e identificação da espécie

A identificação do género *Staphylococcus* spp. foi obtida por amplificação do gene *tuf* através de um multiplex-PCR que permitia também a identificação de 3 espécies de CoNS (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*), tendo este protocolo sido adaptado do descrito por Morot-Bizot, Talon & Leroy (2004) (Figura 6). O PCR foi realizado com um volume final de

50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 0,2 mM de deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 25 mM cada), 0,5 µM de cada um dos oligonucleótidos XylF, XylR, Sap1 e Sap2, 0,4 µM dos oligonucleótidos Se705-1 e Se705-2, 0,2 µM dos oligonucleótidos TstaG422 e Tstag765, 10 µg de BSA/reacção, 1U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific, Chicago, Estados Unidos da América) e 3 µL de ADN. A reacção ocorrida no termociclador consistiu numa primeira fase a 4°C durante 15 minutos, ocorrendo a seguir uma desnaturação inicial (3 minutos a 94°C), seguida de 40 ciclos de desnaturação (1 segundo a 95°C), hibridação (30 segundos a 55°C) e extensão (30 segundos a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (3 minutos a 72°C). Foram incluídos controlos positivos para *S. epidermidis* (ATCC 35984), *S. saprophyticus* (2622/03) e *S. xylosus* (79/2012).

Figura 6 – Multiplex-PCR para identificação do género *Staphylococcus* spp. e *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*. M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo *S. epidermidis*; 2, controlo positivo *S. saprophyticus*; 3, controlo positivo *S. xylosus*; 4 e 5, *Staphylococcus* spp.; 6, *S. epidermidis*; 7, controlo negativo (Fonte: fotografia original).

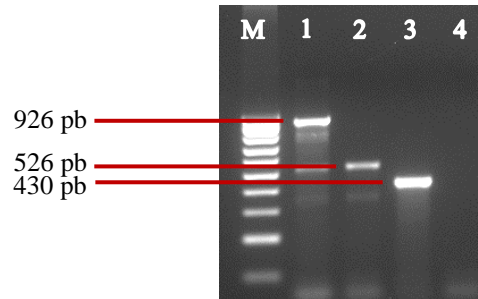


A identificação de *S. aureus*, por amplificação do gene *nuc* específico do mesmo, foi realizada através de um multiplex-PCR que permitia simultaneamente a confirmação da resistência à meticilina, sendo este protocolo descrito posteriormente (capítulo 4.3.3.2).

Para a identificação de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. intermedius* foi feita amplificação do gene *nuc* específico de cada um através de um multiplex-PCR, adaptado do protocolo de Sasaki, Tsubakishita, Tanaka, Sakusabe, Ohtsuka, Hirotaki, Kawakami, Fukata & Hirama-tsu (2010) (Figura 7). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM de cada um dos oligonucleótidos sch-F, sch-R, int-F e int-R3, 0,4 µM de cada um dos oligonucleótidos pse-F2 e pse-R5, 2U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 2 µL de ADN. A reacção ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (2 minutos a 95°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (35 segundos a 56°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando pos-

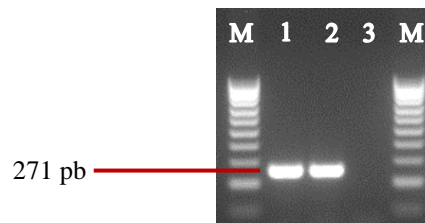
teriormente com uma extensão final (2 minutos a 72°C). Foram incluídos controlos positivos para *S. pseudintermedius* (E5/08), *S. schleiferi* (1152/01) e *S. intermedius* (CCM5739).

Figura 7 – Multiplex-PCR para identificação de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. intermedius*. M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo *S. pseudintermedius*; 2, controlo positivo *S. schleiferi*; 3, controlo positivo *S. intermedius*; 4, controlo negativo (Fonte: fotografia original).



Relativamente ao *S. haemolyticus* foi feita amplificação do gene *mvaA* através de um simplex-PCR, adaptado do protocolo descrito por Pereira, Schuenck, Malvar, Iorio, Matos, Olendzki, Oelemann & dos Santos (2010) (Figura 8). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10x Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25 mM cada), 0,25 µM dos oligonucleótidos Sh-1 e Sh-2, 1,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (3 minutos a 94°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (1 minuto a 56°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (3 minutos a 72°C). Foi incluído controlo positivo para *S. haemolyticus* (A15A/10).

Figura 8 – Simplex-PCR para identificação de *S. haemolyticus*. M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1 controlo positivo *S. haemolyticus*; 2, *S. haemolyticus*; 3, controlo negativo (Fonte: fotografia original).



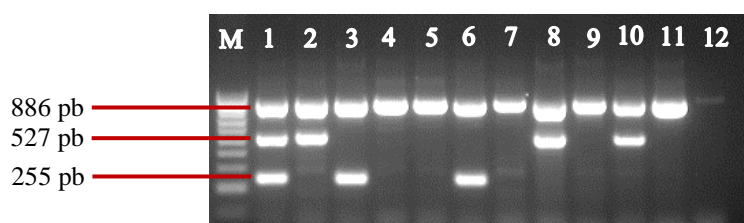
Para identificação do *S. simulans* foi feita amplificação do gene *sodA* através de um simplex-PCR, adaptado do protocolo de Blaiotta, Casaburi & Villani (2005). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10x Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25 mM cada), 0,5 µM dos oligonucleótidos SimF e SimR, 1 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 3 µL de

ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (3 minutos a 95°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 66°C) e extensão (30 segundos a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (5 minutos a 72°C). Foi incluído controlo positivo para *S. simulans* (20/2013).

4.3.3.2. Identificação do gene *mecA*

A confirmação de resistência à meticilina, por amplificação do gene *mecA*, foi obtida através de um multiplex-PCR, adaptado do protocolo descrito por Poulsen, Skov & Pallesen (2003) (Figura 9). Este PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, NZYTaQ 5X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25 mM cada), 0,2 µM dos oligonucleótidos *mecA*-1, *mecA*-2, *nuc*-1, *nuc*-2, 16S-1 e 16S-2, 2,5 U de NZYTaQ (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 2 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (7 minutos a 94°C), seguida de 30 ciclos de hibridação (5 minutos a 61°C), extensão (1 minuto a 72°C) e desnaturação (1 minuto a 94°C), com uma nova hibridação (2 minutos a 61°C), terminando posteriormente com uma extensão final (5 minutos a 72°C). Foi incluído controlo positivo para MRSA (A3/10).

Figura 9 – Multiplex-PCR para identificação de MRSA e *S. aureus*. M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo MRSA; 2 e 10, MRSE; 3 e 6, *S. aureus* suscetível à meticilina; 4, 5, 7, 9 e 11, staphylococci coagulase-negativo suscetível à meticilina; 8, MRSP; 12, controlo negativo (Fonte: fotografia original).



4.3.3.3. Identificação do gene *mecC*

A amplificação do gene *mecC* foi obtida através de um simplex-PCR adaptado do protocolo descrito por Cuny, Layer, Strommenger & Witte (2011). Este PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, NZYTaQ 5X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM dos oligonucleótidos *mecLGA251f* e *mecLGA251r*, 1,5 U de NZYTaQ (NZYTech) e 2 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (1 minuto a 94°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (1 minuto a 50°C) e extensão (1 mi-

nuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (5 minutos a 72°C). Foi utilizado como controlo positivo *S. aureus* LGA251.

4.3.3.4. Detecção de *S. aureus* ST398

Nas estirpes MRSA é possível fazer PCR para determinar se pertencem à ST398, informação essencial para a escolha da enzima de restrição a usar na técnica de PFGE. Assim, o protocolo utilizado foi adaptado do descrito por van Wamel, Manásková, Fluit, Verbrugh, de Neeling, van Duijkeren & van Belkum (2010), consistindo em 2 simplex-PCR realizados em simultâneo. Cada PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, NZYTaQ 5X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM dos oligonucleótidos A07F/C01F e A07R/C01R (Tabela 12), 2,5 U de NZYTaQ (NZYTech) e 3 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (2 minuto a 94°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (1 minuto a 50°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (10 minutos a 72°C). Foi incluído controlo positivo para MRSA ST398 (140.1).

4.3.3.5. Detecção de toxinas

Nas estirpes MRSA pesquisou-se a presença dos genes *luk-F/luk-S* que codificam a PVL através de um simplex-PCR adaptado do protocolo descrito por Lina, Piémont, Godail-Gamot, Bes, Peter, Gauduchon, Vandenesch & Etienne (1999). Este PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,4 µM dos oligonucleótidos luk-PV-1 e luk-PV-2, 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (2 minutos a 94°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 58°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (5 minutos a 72°C). Foi utilizado como controlo positivo MRSA ST80 PVL+.

4.3.4. Caracterização molecular

4.3.4.1. Tipagem *spa*

Esta técnica foi realizada apenas em algumas estirpes MRSA (n=7), tendo sido utilizado um protocolo adaptado do descrito por Shopsin e colegas (1999). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,4 µM dos oli-

gonucleótidos spa1095new e spaextend_f, 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (5 minutos a 94°C), seguida de 35 ciclos de desnaturação (45 segundos a 94°C), hibridação (45 segundos a 62°C) e extensão (90 segundos a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (10 minutos a 72°C). Antes da sequenciação de ADN, os produtos de PCR foram purificados usando o Kit NZYGelpure (NZYTech, Lisboa, Portugal), tendo, posteriormente, a sequenciação sido realizada pela GATC Biotech AG (Constance, Alemanha). As sequências obtidas foram analisadas numa base de dados acessível *online* – Ridom web server (<http://spaserver.ridom.de/>) – para atribuição do tipo *spa*.

4.3.4.2. MLST

Esta técnica foi realizada em algumas estirpes MRSA (n=7), MRSE (n=5) e MRSP (n=1).

O protocolo de MLST para as estirpes MRSA foi adaptado de Enright e colegas (2000). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM de cada oligonucleótido *forward* e *reverse* (Tabela 12), 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (5 minutos a 94°C), seguida de 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 50°C) e extensão (30 segundos a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (10 minutos a 72°C).

No que diz respeito às estirpes MRSE, o protocolo de MLST utilizado foi adaptado de Thomas e colegas (2007). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM de cada oligonucleótido *forward* e *reverse* (Tabela 12), 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (5 minutos a 95°C), seguida de 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (45 segundos a 50°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (10 minutos a 72°C).

Relativamente à estirpe MRSP, o protocolo utilizado foi adaptado de Solyman e colegas (2013). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM de cada oligonucleótido *forward* e *reverse* (Tabela 12), 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 5 µL de ADN. A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (90 segundos a 95°C), seguida de 35 ciclos de des-

naturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 52°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (5 minutos a 72°C).

Para a sequenciação de ADN, os produtos de PCR foram purificados usando o Kit NZYGelpure (NZYTech), tendo, posteriormente, a sequenciação sido realizada pela GATC Biotech AG (Constance). Posteriormente, as sequências obtidas em cada gene para cada amostra foram analisadas numa base de dados acessível *online* (<http://www.mlst.net/> para *S. aureus* e *S. epidermidis*; <http://pubmlst.org/> para *S. pseudintermedius*) para atribuição de ST.

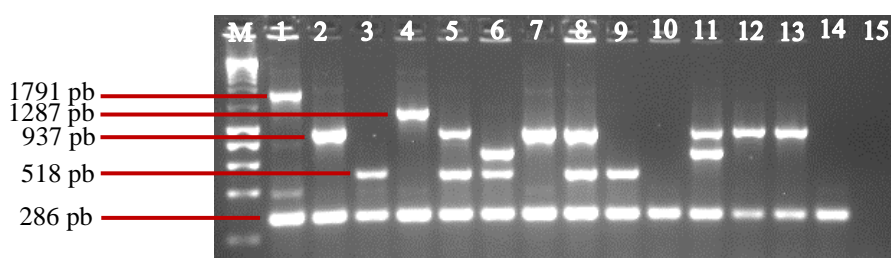
4.3.4.3. Tipagem SCC_{mec}

A determinação do tipo de SCC_{mec} foi realizada em todas as estirpes MRS usando o multiplex-PCR1 (M-PCR1) e multiplex-PCR2 (M-PCR2) descritos por Kondo e colegas (2007) e de acordo com *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements* (IWG-SCC) (2009). O M-PCR1, para amplificação do complexo do gene *ccr*, foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM dos oligonucleótidos mA1, mA2, α1, α2, α3, βc, α4.2, β4.2, γR e γF (Tabela 12), 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific) e 1 µL de ADN. O M-PCR2, para amplificação do complexo do gene *mec*, foi realizado com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix (NZYTech) (de acordo com as instruções do fabricante), 0,4 µM dos oligonucleótidos mI6, IS2 e mA7 (Tabela 12) e 1 µL de ADN. A identificação da classe B do complexo do gene *mec* foi realizada em simplex-PCR com um volume final de 50 µL contendo água MiliQ, DreamTaq 10X Buffer (de acordo com as instruções do fabricante), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (25mM cada), 0,2 µM dos oligonucleótidos IS7 e mA7, 2,5 U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific), DMSO 5% e 1 µL de ADN. As reações ocorridas no termociclador consistiram numa desnaturação inicial (5 minutos a 94°C), seguida de 35 ciclos de desnaturação (2 minutos a 94°C), hibridação (1 minuto a 57°C no caso do M-PCR1 ou a 60°C no caso do M-PCR2) e extensão (3 minutos a 72°C), terminando posteriormente com uma extensão final (8 minutos a 72°C). Foram utilizados como controlos positivos MRSS SCC_{mec} III (A8A/08), MRSA SCC_{mec} IV (1504A/08), MRSP SCC_{mec} V (1879B/08) e MRSA SCC_{mec} VI (A3/10).

O tipo de SCC_{mec} foi atribuído de acordo com a combinação do tipo de complexo do gene *ccr* com a classe do complexo do gene *mec* (IWG-SCC, 2009; IWG-SCC, 2013). O complexo do gene *ccr* foi considerado Não Detetável (ND) quando havia amplificação do gene *mecA* (controlo interno) sem amplificação de *ccr* no M-PCR1 (Figura 10). O complexo do gene *mec* foi considerado Não Tipável (NT) quando não havia amplificação de *mec* ou o fragmento

amplificado apresentava um tamanho diferente do descrito no M-PCR2. *SCCmec* foi considerado NT quando o complexo do gene *ccr* não era detetado ou existiam múltiplos tipos de *ccr* e/ou ausência de uma classe de gene *mec* tipável ou uma combinação entre complexo do gene *ccr* tipável e complexo do gene *mec* tipável não descrita anteriormente (Figura 10).

Figura 10 – M-PCR1 para identificação do complexo do gene *ccr*. M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder III; 1, controlo positivo *SCCmec* III; 2, controlo positivo *SCCmec* IV; 3, controlo positivo *SCCmec* V; 4, controlo positivo *SCCmec* VI; 5, 8 e 11, MRSE *SCCmec* NT (múltiplos tipos *ccr*); 6, MRSH *SCCmec* NT (múltiplos tipos *ccr*); 7, MRSE *SCCmec* IV; 9, MRSH *SCCmec* V; 10, MRSH *SCCmec* NT (tipo *ccr* não detetável); 12 e 13, MRSE *SCCmec* IV; 14, MRSE *SCCmec* NT (tipo *ccr* não detetável); 15, controlo negativo (Fonte: fotografia original).



4.3.4.4. PFGE

O protocolo de PFGE utilizado foi adaptado de Murchan e colegas (2003), com algumas modificações, tendo sido realizado em todas as estirpes MRS. Resumidamente, as estirpes MRS foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (“Brain Heart Infusion Broth”, BHIB) (Biokar Diagnostics, França) durante a noite e incorporadas em 2% de agarose (Sea-Kem GTG Agarose, Rockland, EUA). A lise das células, proteínas e do ácido ribonucleico (ARN) foi efetuada, numa primeira fase, pela lisozima (100 µg), lisostafina (12,5 µg) e RNase (48,75 µg) durante 2h a 37°C e, posteriormente, pela proteinase K (1 mg) durante a noite a 50°C. A restrição enzimática foi realizada com a enzima *SmaI* (20U) (em estirpes MRSA não ST398, MR-CoNS e MRSP) ou a enzima *ApaI* (20U) (em estirpes MRSA ST398) à temperatura ambiente durante a noite. A eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, San Diego, EUA) em gel de agarose a 1,1% com as seguintes condições de corrida: i) um pulso de 5s-15s a 6V/cm durante 10h seguido de outro pulso de 15s-60s a 6V/cm durante 13h para estirpes MRSA não ST398 e MR-CoNS; ii) um pulso de 2s-5s a 5.6V/cm durante 24h para estirpes MRSP; e iii) um pulso de 2s-5s a 6V/cm durante 20h para estirpes MRSA ST398. Como marcador de referência foi utilizada a estirpe *S. aureus* NCTC 8325 (Tenover et al., 1995).

Os perfis de macrorestrição obtidos foram analisados no programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Math, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando o método de agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”,

UPGMA) e o coeficiente de similaridade de Dice. Para a definição de grupo clonal (*cluster*) e de subgrupo clonal foram utilizados os critérios de Carriço e colegas (2005): pelo menos 80% de semelhança para inclusão no mesmo grupo clonal e pelo menos 97% de semelhança para o mesmo subgrupo/subtipo clonal, com uma tolerância de posição de bandas de 1,7% e otimização de 1%.

4.4. Análise estatística

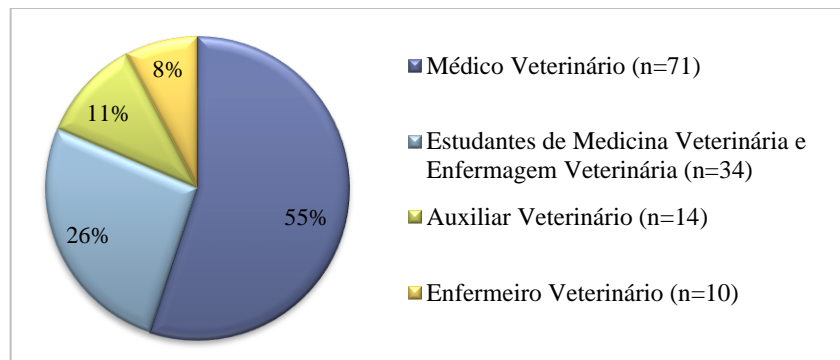
Para a análise estatística dos resultados foram utilizados o Microsoft® Office Excel 2010 e o programa informático SAS versão 9.3 (SAS Institute, USA). Os fatores de risco foram determinados por regressão logística. Considerou-se que as diferenças encontradas eram significativas quando o valor de $P \leq 0,05$. Na análise dos fatores de risco, as perguntas sem resposta foram excluídas e os auxiliares e enfermeiros veterinários foram agrupados de modo a tornar os grupos mais homogéneos.

5. RESULTADOS

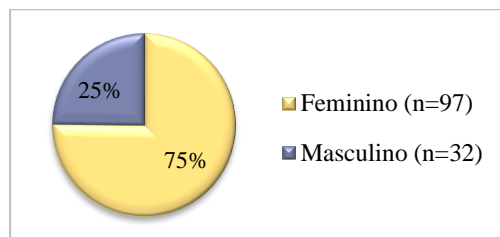
5.1. Caracterização da amostra populacional

Neste estudo foram incluídos 129 participantes, dos quais 71 eram médicos veterinários (55%), 34 estudantes de Medicina Veterinária e Enfermagem Veterinária (26%), 14 auxiliares veterinários (11%) e 10 enfermeiros veterinários (8%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição da população amostrada (n=129) por grupo profissional.



Esta amostra populacional era constituída, maioritariamente, por indivíduos do sexo feminino (75%), sendo que só 25% da amostra era do sexo masculino (Gráfico 2). A idade média dos participantes foi de 33 anos (mínimo, máximo e desvio padrão de 21, 63 e 9 anos, respetivamente).

Gráfico 2 – Distribuição da população amostrada por sexo.


5.2. Questionário

No Gráfico 3 é possível observar os resultados gerais do questionário. Dos 129 participantes, 30 (23%) indicaram que tomaram antibióticos nos 6 meses anteriores à colheita de amostra e 42 (33%) no último ano. Foram várias as classes de antibióticos indicadas, mas a mais referida foi a dos β -Lactâmicos (Gráfico 4 e Gráfico 5).

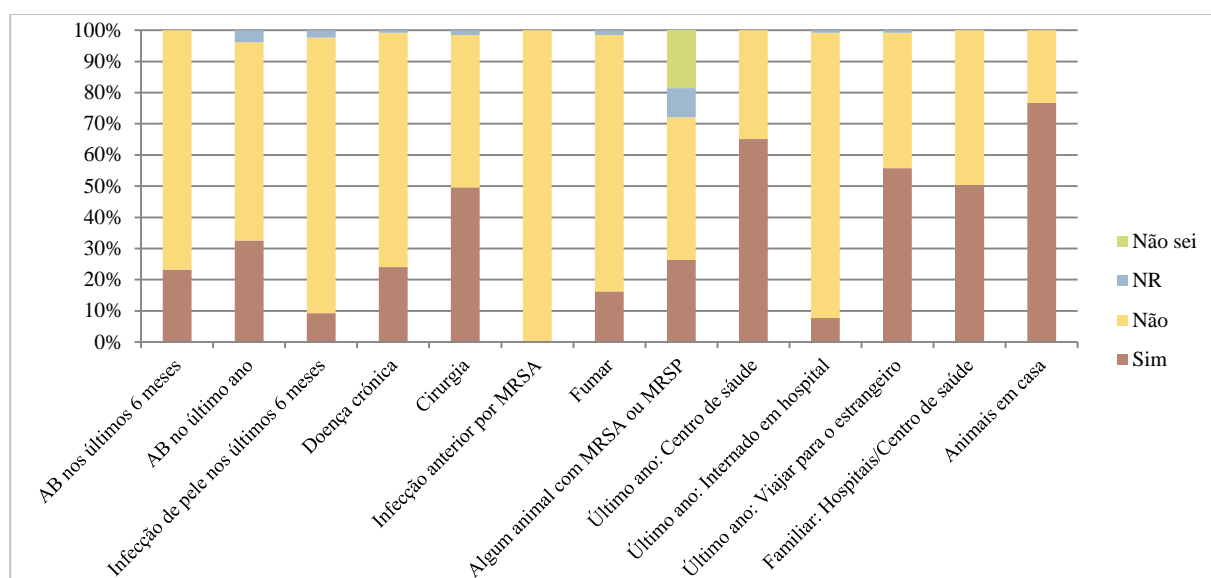
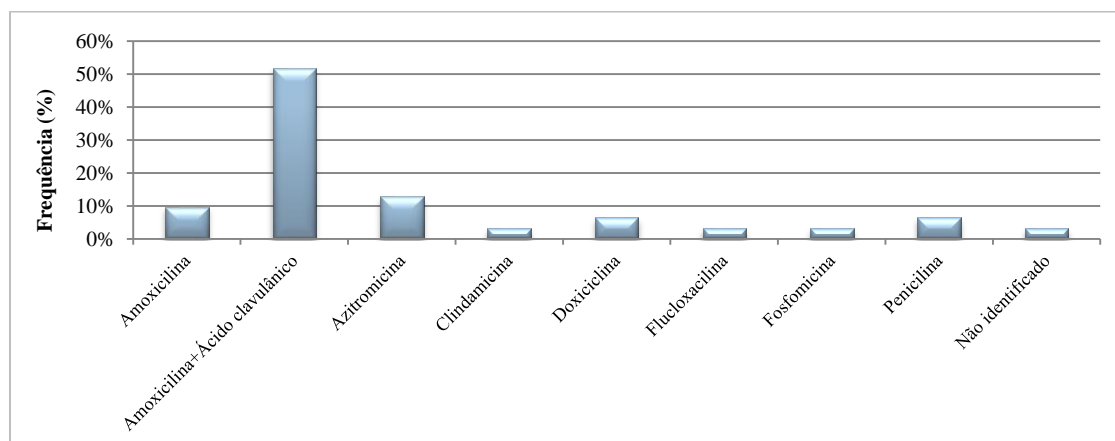
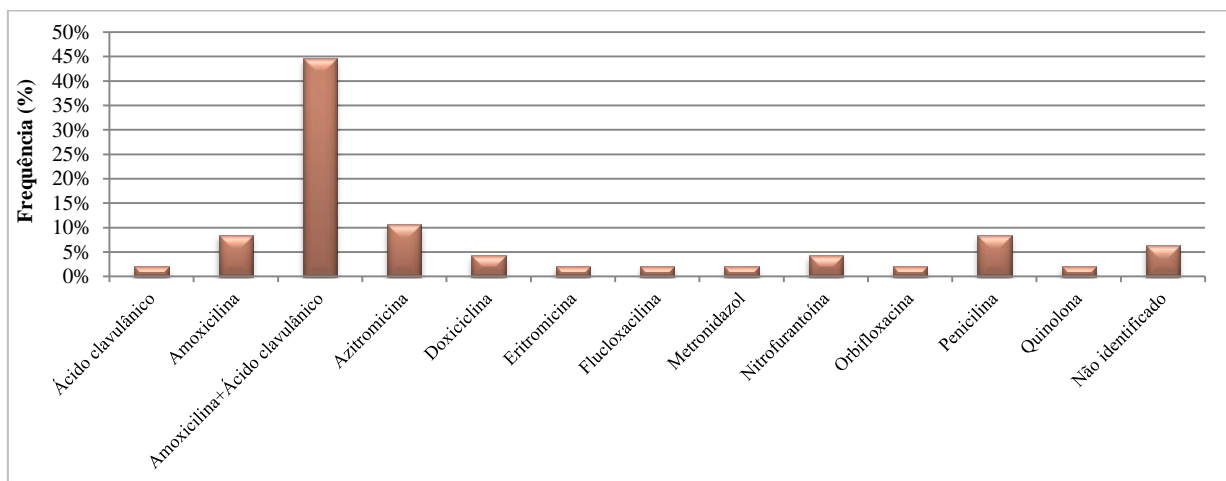
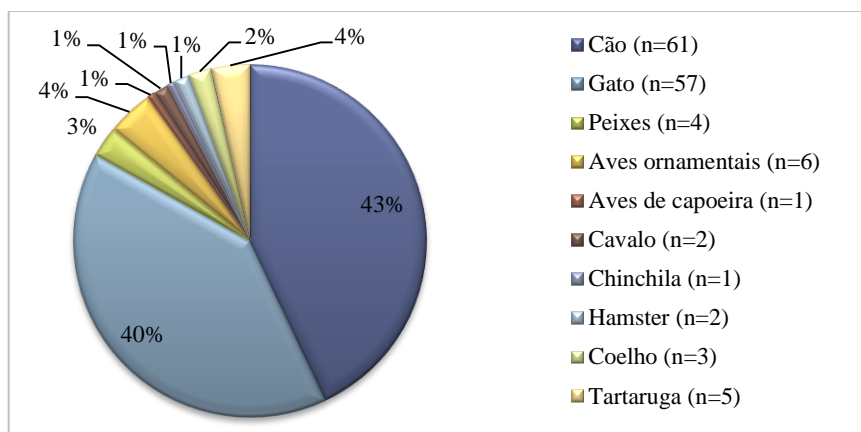
Gráfico 3 – Frequência de resposta às perguntas do questionário realizado aos participantes. NR – Não respondeu.

Gráfico 4 – Antibióticos tomados pelos participantes nos 6 meses anteriores à entrada no estudo. Nota: alguns participantes indicaram mais do que 1 antibiótico.


Gráfico 5 – Antibióticos tomados pelos participantes no ano anterior à entrada no estudo. Nota: alguns participantes indicaram mais do que 1 antibiótico.



No que diz respeito às restantes perguntas, 12 pessoas (9%) referiram ter tido infeção de pele nos últimos 6 meses; 31 (24%) sofriam de doença crónica; 64 (50%) já tinham sido submetidas a uma cirurgia na sua vida e 21 (16%) eram fumadoras. Nenhum dos participantes teve uma infeção anterior por MRSA, mas 34 (26%) referiram ter diagnosticado/tratado/contactado com um animal com infeção por MRSA ou MRSP e 24 (19%) não sabiam se tinham contactado com algum animal com infeção por MRSA ou MRSP. No último ano, 84 pessoas (65%) referiram que foram a centros de saúde; 10 (8%) estiveram internadas no hospital e 72 (56%) viajaram para o estrangeiro. Sessenta e cinco pessoas (50%) referiram que tinham familiares que vão regularmente a hospitais ou centros de saúde seja por motivos de doença ou profissão. Relativamente à presença de animais em casa, a maioria (77%) disse que sim, sendo o cão e o gato o mais frequente (43% e 40%, respetivamente) (Gráfico 6). Os dados mais detalhados de resposta a cada questão do questionário estão no Anexo 8.

Gráfico 6 – Animais de estimação referidos pelos participantes. Nota: vários participantes indicaram mais do que 1 animal.



5.3. Frequência de colonização nasal por MRS e caracterização das estirpes

Dos 129 participantes, 79 (61%, [52,27; 69,69]) estavam colonizados por, pelo menos, uma espécie de MRS [*S. epidermidis* (n=68), *S. aureus* (n=19), *S. haemolyticus* (n=7), *S. pseudintermedius* (n=2) e outros CoNS (n=4)]. Estes MRS foram identificados em 51 médicos veterinários, 10 estudantes de Medicina Veterinária (M.V.) e Enfermagem Veterinária (E.V.), 10 auxiliares veterinários e 8 enfermeiros veterinários. A distribuição dos isolados MRS pelos vários grupos profissionais está na Tabela 8 e no Gráfico 7. De referir que a maioria das pessoas (n=61; 77%) estava colonizada apenas por uma espécie de MRS, mas 18 pessoas (23%; 11 médicos veterinários, 3 estudantes, 3 auxiliares e 1 enfermeiro) apresentavam uma co-colonização por 2 ou 3 espécies diferentes (Gráfico 8).

Tabela 8 – Distribuição dos isolados MRS pelos vários grupos profissionais.

	Médico Veterinário	Estudante de M.V. e E.V.	Auxiliar Veterinário	Enfermeiro Veterinário
Total de pessoas (n=129)	71	34	14	10
Pessoas com MRS (n=79)	51	10	10	8
Isolados MRS (n=100)	64	13	13	10

Gráfico 7 – Distribuição das espécies de MRS pelos vários grupos profissionais.

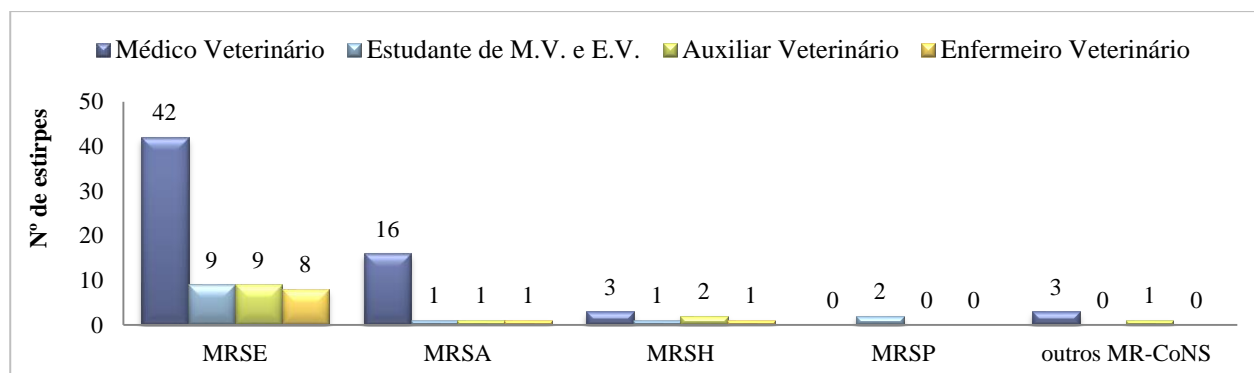
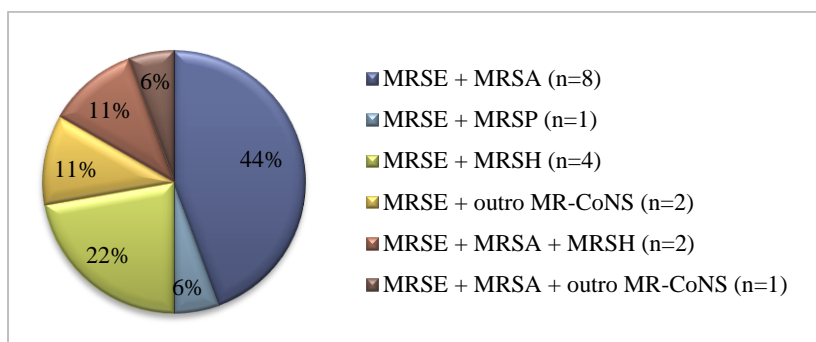


Gráfico 8 – Espécies de MRS encontradas em co-colonização.



Através do Gráfico 7 é possível observar que o MRSE foi a espécie mais frequentemente encontrada em qualquer um dos grupos, o MRSA foi predominantemente encontrado em médicos veterinários e os MRSP surgiram apenas em estudantes.

Os 100 isolados de staphylococci *mecA* positivos foram comparados por PFGE e tipo de *SCCmec*, tendo ainda sido realizada a tipagem *spa* e MLST em alguns (Tabela 9). Nas estirpes MRSA, o *SCCmec* IV (n=14) foi o mais frequente, seguido dos tipos V (n=3), II e VI (ambos com 1 estirpe cada). Com a tipagem *spa* e MLST foram identificados 3 clones: ST22-t032-IV (n=3), referido como clone EMRSA-15; ST398-t108-V (n=3), referido como clone LA-MRSA; e ST105-t002-II (n=1) designado clone relacionado ao Nova Iorque/Japão (Tabela 9). A análise de PFGE revelou 4 padrões (SA-A ao SA-D), sendo que no padrão C existem 4 subtipos (C1-C4) e estirpes de várias origens diferentes (Figura 11). No padrão SA-A estava o MRSA ST105-II; no padrão SA-C2 estava o clone EMRSA-15, sendo que neste padrão é onde se encontra a maioria das estirpes MRSA; e o clone LA-MRSA estava no padrão SA-D. Verificou-se uma associação entre os tipos de cassete e os padrões de PFGE: no padrão A estava o *SCCmec* II; no B estava o *SCCmec* VI; no C estava o *SCCmec* IV e no D estava o *SCCmec* V (Figura 11). De uma maneira geral, as estirpes MRSA de pessoas que trabalhavam juntas eram muito similares no PFGE, com exceção das pessoas ID 032, 036 e 128 (Figura 11). Todas as estirpes MRSA foram negativas para os genes da PVL.

No que diz respeito às estirpes MRSP, o *SCCmec* II-III foi o único identificado, tendo também sido identificado apenas um padrão de PFGE (SP-A) (Figura 12). A análise MLST de uma das estirpes levou à identificação do clone ST71. As pessoas (ID 022 e ID 033) em que foram isoladas estas estirpes estavam a estagiar no mesmo local.

Nas estirpes MRSE observou-se uma maior diversidade genética, tanto no tipo de *SCCmec* presente como nos padrões de PFGE. O *SCCmec* predominante foi o IV (n=30), seguido do *SCCmec* NT (n=29), II (n=4), V (n=3), III e VI (ambos com 1 estirpe cada). O *SCCmec* foi considerado NT devido à presença de: i) combinações entre complexo *ccr* e complexo *mec* não descritas; ii) múltiplos tipos de *ccr*; e iii) complexo do gene *ccr* e/ou gene *mec* não detetáveis (Figura 10 e Tabela 14 no Anexo 9). A análise MLST permitiu a identificação de duas ST: ST5 (n=2) e ST35 (n=3); ambas pertencentes ao CC5. Foram encontrados 7 padrões de PFGE (SE-A ao SE-G), muitos deles com vários subtipos, no entanto a maioria das estirpes estava em 3 padrões principais (SE-A, SE-B e SE-C) (Tabela 9 e Figura 13). As estirpes MRSE ST5 estavam no padrão SE-C e as estirpes MRSE ST35 no padrão SE-A (Tabela 9). Todos os padrões de PFGE, exceto os padrões SE-F e -G, continham estirpes MRSE de várias origens diferentes. De uma maneira geral, as pessoas que trabalhavam na mesma clínica/hospital veterinário estavam colonizadas por estirpes MRSE geneticamente relacionadas por PFGE, tendo sido identificados vários clones partilhados entre essas pessoas (padrões SE-A12, -C17, -C22 e -D3) (Tabela 9 e Figura 13). Contudo, foram também identificadas estirpes distintas em pessoas que trabalhavam no mesmo local. Por outro lado, foram identificadas

algumas estirpes MRSE geneticamente relacionadas em pessoas de diferentes clínicas/hospitais veterinários, tendo sido identificados 6 clones partilhados (padrões SE-A10, -A12, -C16, -C19, -C20 e -C22) entre pessoas de diferentes locais (Tabela 9 e Figura 13).

Relativamente às estirpes MRSH, apresentavam um *SCCmec* NT (n=5) ou do tipo V (n=2) (Tabela 9). As razões que levaram à classificação do *SCCmec* como NT são semelhantes às observadas para o MRSE (Figura 10 e Tabela 14 no Anexo 9). Também se observou bastante diversidade genética com a identificação de 5 padrões de PFGE (SH-A ao SH-E) (Figura 14). Foi identificado um clone em duas pessoas (ID 003 e 005) que trabalhavam no mesmo local, contudo era diferente dos clones encontrados em mais pessoas (ID 004 e 043) desse mesmo local de trabalho (Figura 14).

Tabela 9 – Características das estirpes MRS (n=100) isoladas das 79 pessoas colonizadas.

ID	Profissão ^a	Origem ^b	1ª análise (T0)					Seguimento (T1)			
			Isolado ^c	<i>SCCmec</i> ^d	<i>spa</i>	ST (CC) ^e	PFGE ^f	Estirpe ^g	<i>SCCmec</i>	ST (CC)	PFGE ^f
001	Médico Veterinário	Vet1	MRSE	V			SE-F	MRSE	V		SE-B13
002	Médico Veterinário	Vet1	MRSE	IV			SE-B8	MRSA	V	398 (398)	SA-D
								MRSE	V		SE-B13
003	Estudante de M. V.	Vet1	MRSE	NT			SE-A14	MRSE	V		SE-B11
			MRSH	NT			SH-B1	MRSH	V		SH-A3
004	Auxiliar Veterinário	Vet1	MRSE	II			SE-A10	MRSE	IV		SE-C13
			MRSH	NT			SH-D	MRSA	V	398 (398)	SA-D
005	Auxiliar Veterinário	Vet1	MRSE	IV			SE-C16	MRSE	V		SE-B13
			MRSH	NT			SH-B1	MRSA	V	398 (398)	SA-D
007	Médico Veterinário	Vet1	MRSE	NT			SE-E1	MRSA	V	398 (398)	SA-D
								MRSE	VI		SE-C25
008	Médico Veterinário	Vet1	MRSA	IV	t032	22 (22)	SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
			MRSE	NT		5 (5)	SE-C22	MRSE	NT		SE-C22
009	Enfermeiro Veterinário	Vet1	MRSE	NT			SE-A12	MRSE	NT		SE-A9
010	Estudante de M. V.	Vet1	MRSE	NT			SE-A7	MRSA	V	398 (398)	SA-D
011	Médico Veterinário	Vet1	MRSA	IV	t032	22 (22)	SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
012	Médico Veterinário	Vet1	MR-CoNS	NT			n.a.	-			
022	Estudante de M. V.	Vet2	MRSP	II-III		71 (71)	SP-A	MRSP	II-III		SP-A
023	Estudante de M. V.	Vet3	MRSE	NT		35 (5)	SE-A15	MRSE	V		SE-B13
027	Médico Veterinário	Vet2	MRSE	NT			SE-C22	MRSE	NT		SE-B8
032	Médico Veterinário	Vet2	MRSA	II	t002	105 (5)	SA-A	MRSA	II		SA-A
033	Estudante de E.V.	Vet2	MRSE	NT			SE-A13	-			
			MRSP	II-III			SP-A				
034	Médico Veterinário	Vet2	MRSH	NT			SH-A2	-			
035	Enfermeiro Veterinário	Vet2	MRSE	IV			SE-C23	MRSE	NT		SE-C12
036	Médico Veterinário	Vet2	MRSA	IV	t032	22 (22)	SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
			MRSE	IV		5 (5)	SE-C19	MRSE	IV		SE-C19
037	Enfermeiro Veterinário	Vet2	MRSE	NT			SE-B2	MRSE	NT		SE-C9
042	Médico Veterinário	Vet1	MRSA	V	t108	398 (398)	SA-D	MR-CoNS	IV		n.a.
			MRSE	II		35 (5)	SE-A12	MRSE	NT		SE-A12

ID	Profissão ^a	Origem ^b	1ª análise (T0)					Seguimento (T1)			
			Isolado ^c	SCCmec ^d	spa	ST (CC) ^e	PFGE ^f	Estirpe ^g	SCCmec	ST (CC)	PFGE ^f
043	Médico Veterinário	Vet1	MRSA	V	t108	398 (398)	SA-D	MRSE	IV		SE-C26
			MRSE	NT		35 (5)	SE-A12				
			MRSH	NT			SH-E				
044	Médico Veterinário	Vet4	MRSA	V	t108	398 (398)	SA-D	-			
046	Médico Veterinário	Vet2	MRSE	IV			SE-D2	MRSE	IV		SE-D2
			MRSH	V			SH-C1	MRSH	V		SH-C1
047	Auxiliar Veterinário	Vet2	MRSE	IV			SE-C4	MRSE	IV		SE-C2
048	Enfermeiro Veterinário	Vet2	MRSE	NT			SE-C16	MRSE	NT		SE-C9
049	Auxiliar Veterinário	Vet2	MRSE	IV			SE-C17	MRSE	IV		SE-C11
050	Médico Veterinário	Vet2	MRSE	IV			SE-C6	MRSE	IV		SE-B6
052	Auxiliar Veterinário	Vet2	MRSE	NT			SE-C22	MRSE	IV		SE-C22
053	Estudante de M. V.	Fac1	MRSE	NT			SE-C17	MRSE	IV		SE-C31
054	Médico Veterinário	Vet2	MRSE	NT			SE-C10	-			
056	Médico Veterinário	Vet5	MRSE	IV			SE-C8	n.p.			
058	Médico Veterinário	Vet6	MRSE	NT			SE-A12	MRSE	NT		SE-A11
059	Médico Veterinário	Vet7	MRSE	NT			SE-A6	n.p.			
063	Médico Veterinário	Ind1	MRSE	IV			SE-C5	n.p.			
064	Médico Veterinário	Ind2	MRSE	IV			SE-B5	n.p.			
065	Médico Veterinário	Vet7	MRSE	IV			SE-E2	n.p.			
066	Médico Veterinário	Vet8	MRSA	IV			SA-C1	n.p.			
			MRSE	NT			SE-A5				
069	Médico Veterinário	Vet9	MRSE	IV			SE-C18	n.p.			
070	Médico Veterinário	Vet10	MRSE	IV			SE-B4	MRSE	IV		SE-B4
074	Médico Veterinário	Vet8	MRSA	IV			SA-C1	n.p.			
			MRSE	III			SE-G				
075	Médico Veterinário	Vet11	MRSE	NT			SE-C20	MRSE	NT		SE-C20
076	Médico Veterinário	Vet12	MRSE	NT			SE-C7	n.p.			
077	Médico Veterinário	Vet13	MRSE	VI			SE-C25	-			
078	Médico Veterinário	Vet14	MRSE	IV			SE-B12	MRSE	IV		SE-B12
079	Estudante de M. V.	NR	MRSE	II			SE-A10	n.p.			
080	Médico Veterinário	Vet14	MRSE	NT			SE-A1	n.p.			
081	Médico Veterinário	NR	MRSE	IV			SE-C16	n.p.			
082	Médico Veterinário	NR	MRSE	NT			SE-C19	n.p.			
083	Médico Veterinário	NR	MRSE	IV			SE-C21	n.p.			
084	Médico Veterinário	Fac1	MRSE	IV			SE-D1	MRSE	IV		SE-D1
085	Médico Veterinário	Vet7	MRSE	IV			SE-D4	n.p.			
086	Estudante de M. V.	Fac1	MRSE	IV			SE-A2	-			
092	Estudante de M. V.	Fac1	MRSE	NT			SE-A4	MRSE	NT		SE-A4
096	Médico Veterinário	Ind3	MRSE	NT			SE-B10	n.p.			
098	Auxiliar Veterinário	Vet15	MRSA	IV			SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
100	Médico Veterinário	Vet15	MRSA	IV			SA-C2	n.p.			
			MRSE	NT			SE-A3				
101	Auxiliar Veterinário	Vet15	MRSE	IV			SE-C1	MRSE	IV		SE- C1
								MRSH	NT		SH-B2
			MRSA	IV			SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
103	Enfermeiro Veterinário	Vet15	MRSE	IV			SE-B9	MRSH	V		SH-A1
			MRSH	V			SH-A1				

ID	Profissão ^a	Origem ^b	1ª análise (T0)				Seguimento (T1)				
			Isolado ^c	SCCmec ^d	<i>spa</i>	ST (CC) ^e	PFGE ^f	Estirpe ^g	SCCmec	ST (CC)	PFGE ^f
104	Médico Veterinário	Vet15	MRSA	IV			SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
105	Médico Veterinário	Vet16	MRSE	IV			SE-B3	MRSE	NT		SE-C14
								MRSH	NT		SH-C2
107	Médico Veterinário	Vet16	MRSE	IV			SE-C28	n.p.			
108	Enfermeiro Veterinário	Vet16	MRSE	NT			SE-C3	MRSE	IV		SE-C3
109	Médico Veterinário	Vet16	MRSE	II			SE-C11	MRSE	II		SE-C11
110	Auxiliar Veterinário	Vet11	MRSE	IV			SE-C29	MRSE	IV		SE-C24
111	Enfermeiro Veterinário	Vet11	MRSE	NT			SE-B1	MRSE	NT		SE-B1
								MR-CoNS	NT		n.a.
112	Médico Veterinário	Vet11	MRSA	IV			SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
			MRSE	V			SE-B13	MRSE	V		SE-B13
113	Estudante de M. V.	Vet11	MRSA	IV			SA-C2	MRSA	IV		SA-C2
			MRSE	V			SE-A8	MRSE	NT		SE-A9
114	Médico Veterinário	Vet11	MRSE	NT			SE-C15	MRSE	IV		SE-C15
			MR-CoNS	NT			n.a.				
115	Médico Veterinário	Vet11	MRSE	IV			SE-C30	MRSE	IV		SE-C30
116	Médico Veterinário	Vet11	MRSA	IV			SA-C4	MRSA	IV		SA-C4
								MRSE	IV		SE-C27
117	Médico Veterinário	Vet5	MRSE	IV			SE-B7	n.p.			
120	Auxiliar Veterinário	Vet5	MRSE	IV			SE-C20	n.p.			
121	Médico Veterinário	Vet5	MRSA	IV			SA-C2	n.p.			
124	Médico Veterinário	Vet5	MRSE	IV			SE-D3	n.p.			
125	Médico Veterinário	Vet5	MRSA	IV			SA-C3	n.p.			
126	Auxiliar Veterinário	Vet5	MRSE	NT			SE-D3	n.p.			
			MR-CoNS	NT			n.a.				
128	Médico Veterinário	Vet2	MRSA	VI			SA-B				
			MRSE	IV			SE-C17	MRSE	IV		SE-C17
			MR-CoNS	NT			n.a.				
129	Enfermeiro Veterinário	Vet11	MRSE	NT			SE-C19	n.p.			

^aM.V.: Medicina Veterinária, E.V.: Enfermagem Veterinária; ^bVet1-16: Clínicas ou Hospitais Veterinários, Fac1: Faculdade de M.V., Ind1-3: Indústrias Farmacêuticas, NR: Não respondeu; ^cNT: Não Tipável; ^dST (CC): Sequência Tipo (Complexo Clonal); ^ePadrões de PFGE identificados em cada espécie, SA: *S. aureus*, SE: *S. epidermidis*, SH: *S. haemolyticus*, SP: *S. pseudintermedius*, n.a.: não avaliado; ^gn.p.: não participou no estudo de seguimento, -: não foram encontrados MRS.

5.4. Fatores de risco

Na Tabela 10 estão os resultados da análise de fatores de risco associados a colonização por MRS. A variável “infecção anterior por MRSA” foi excluída da análise estatística dado que nenhum dos participantes referiu ter tido alguma. Os profissionais veterinários (médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares veterinários) tiveram maior probabilidade ($P < 0.0001$, $OR = 6.369$, $[2.683-15.122]$) de estarem colonizados que os estudantes. Contudo, a comparação entre os médicos veterinários e os auxiliares e enfermeiros veterinários não evidenciou diferenças significativas ($P = 0.7635$). Um outro fator de risco identificado foi o ter diagnosti-

cado/tratado/contactado com um animal positivo para MRSA ou MRSP (P=0.0361, OR=2.742, [1.067-7.045]) (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise de fatores de risco para colonização por MRS.

	Amostra N (%)	N	OR ^a	MRS IC 95% ^b	P value ^c
Grupo de risco					
Estudantes de M.V. e E.V.	34 (26%)	10	ref.		
Profissionais Veterinários ^d	95 (74%)	69	6.369	2.683 - 15.122	<0.0001
Médico Veterinário	71 (55%)	51	ref.		
Enfermeiro e Auxiliar Veterinários	24 (19%)	18	1.176	0.408 - 3.392	0.7635
Sexo					
Feminino	62 (75%)	60	ref.		
Masculino	32 (25%)	19	0.901	0.399 - 2.038	0.8028
Antibiótico nos últimos 6 meses					
Não	99 (76.7%)	60	ref.		
Sim	30 (23.3%)	19	1.123	0.482 - 2.614	0.7883
Antibiótico no último ano					
Não	82 (63.6%)	50	ref.		
Sim	42 (32.6%)	24	0.853	0.401 - 1.816	0.6806
Infeção de pele nos últimos 6 meses					
Não	114 (88%)	68	ref.		
Sim	12 (9.3%)	9	2.029	0.521 - 7.900	0.3074
Doença crónica					
Não	97 (75.2%)	59	ref.		
Sim	31 (24%)	19	1.020	0.445 - 2.338	0.9632
Cirurgia					
Não	63 (48.8%)	36	ref.		
Sim	64 (49.6%)	43	1.536	0.746 - 3.161	0.2442
Fumar					
Não	106 (82%)	68	ref.		
Sim	21 (16.3%)	10	0.508	0.198 - 1.306	0.1597
Animal com infeção por MRSA ou MRSP					
Não	59 (45.7%)	32	ref.		
Sim	34 (26.3%)	26	2.742	1.067 - 7.045	0.0361
Centro de Saúde no último ano					
Não	45 (34.9%)	28	ref.		
Sim	84 (65.1%)	51	0.938	0.446 - 1.977	0.8672
Internado em hospital no último ano					
Não	118 (91%)	74	ref.		
Sim	10 (7.8%)	5	0.595	0.163 - 2.170	0.4312
Viajar para o estrangeiro no último ano					
Não	56 (43.4%)	38	ref.		
Sim	72 (55.8%)	40	0.592	0.286 - 1.227	0.1585
Animais em casa					
Não	30 (23.3%)	18	ref.		
Sim	99 (76.7%)	61	1.070	0.464 - 2.468	0.8731

^aOR: Odds ratio, ref.: variável de referência; ^bIC: Intervalo de confiança; ^cvariáveis estatisticamente significativas sublinhadas; ^dProfissionais veterinários: médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares veterinários.

Apesar de a análise individual das variáveis “infecção de pele nos últimos 6 meses”, “doença crónica” e “cirurgia” não ser estatisticamente significativa, quando estas variáveis são agrupadas, a análise de fatores de risco já é estatisticamente significativa (Tabela 11).

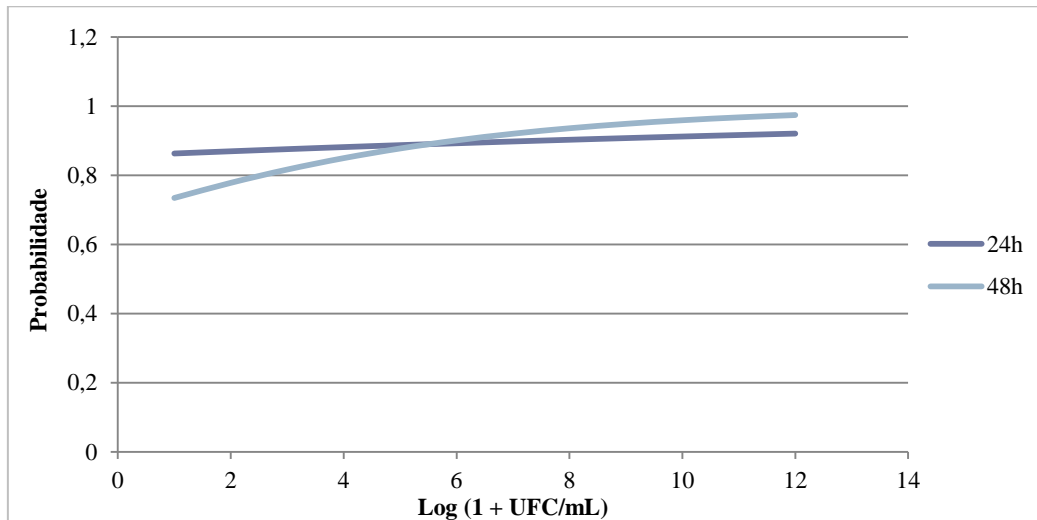
Tabela 11 – Análise agrupada de três variáveis.

	MRS		
	OR	IC 95%	P value
Ter tido infecção de pele nos últimos 6 meses ou ter doença crónica ou ter sido submetido a cirurgia	2.549	1.209 - 5.377	0.0140
Ter doença crónica ou ter sido submetido a cirurgia	2.292	1.101 - 4.769	0.0266

Foi também realizada uma análise de fatores de risco para colonização por cada uma das espécies de MRS. O ser profissional veterinário (médico veterinário, enfermeiro e auxiliar veterinários), comparativamente a ser estudante, foi estatisticamente significativo para colonização por MRSE ($P=0.0006$, $OR=4.552$, $[1.912-10.838]$), contudo, a comparação entre os médicos veterinários e os auxiliares e enfermeiros veterinários não apresentou diferenças significativas ($P=0.3107$). O fator “ser profissional veterinário” está também no limite do estatisticamente significativo ($P=0.0513$, $OR=7.712$, $[0.989-60.169]$) para colonização por MRSA. A variável “tomar algum antibiótico nos últimos 6 meses” foi identificado como fator de risco para colonização por MRSH ($P=0.0087$, $OR=9.700$, $[1.776-52.978]$).

De modo a determinar o efeito da carga nasal bacteriana da primeira análise na presença de MRS no estudo de seguimento, as contagens totais (UFC/mL) realizadas nas placas de agar Brilliance™ MRSA2 foram analisadas apenas para as pessoas que participaram no estudo de seguimento. Para tal, os números de UFC/mL às 24h e 48h foram transformados em logaritmo de base 10 ($\log[1 + \text{UFC}]$) e analisados estatisticamente. As contagens obtidas nos dois momentos temporais não são estatisticamente significativas (24h: $P=0.6785$, $OR=1.057$, $[0.813-1.374]$; 48h: $P=0.0965$, $OR=1.269$, $[0.958-1.681]$), ou seja, a presença de MRS na análise de seguimento é independente do número de UFC/mL obtidas na primeira análise. No entanto, a contagem às 48h é um melhor preditor da presença de MRS na análise de seguimento, pois a análise estatística está mais próxima do nível de significância ($P \leq 0,05$). O Gráfico 9 mostra a evolução da probabilidade de ter MRS na análise de seguimento consoante as contagens realizadas na primeira análise, verificando-se que à medida que a contagem de UFC/mL aumenta, aumenta também a probabilidade de ter MRS na análise de seguimento, sendo que tal situação é mais evidente às 48h.

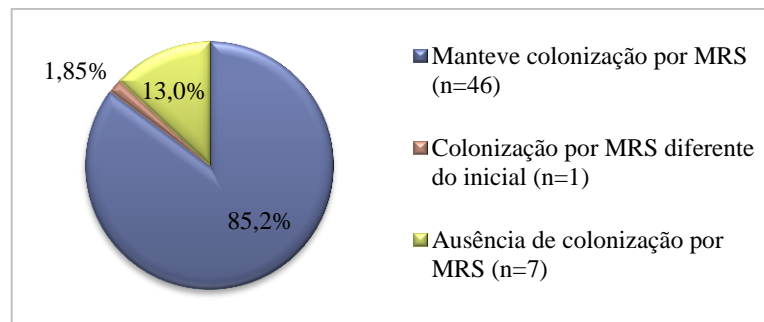
Gráfico 9 – Evolução da probabilidade de presença de MRS na análise de seguimento consoante a contagem de UFC/mL ($\log[1 + \text{UFC}]$) da primeira análise.



5.5. Estudo de seguimento

Das 79 pessoas colonizadas com MRS, 54 participaram no estudo de seguimento (T1), realizado 1 a 4 meses após a primeira análise. A maioria (85%) manteve colonização por, pelo menos, uma das espécies de MRS identificadas inicialmente, sendo que numa pessoa (ID 010) foi identificada uma espécie diferente da inicialmente presente (Gráfico 10 e Tabela 9).

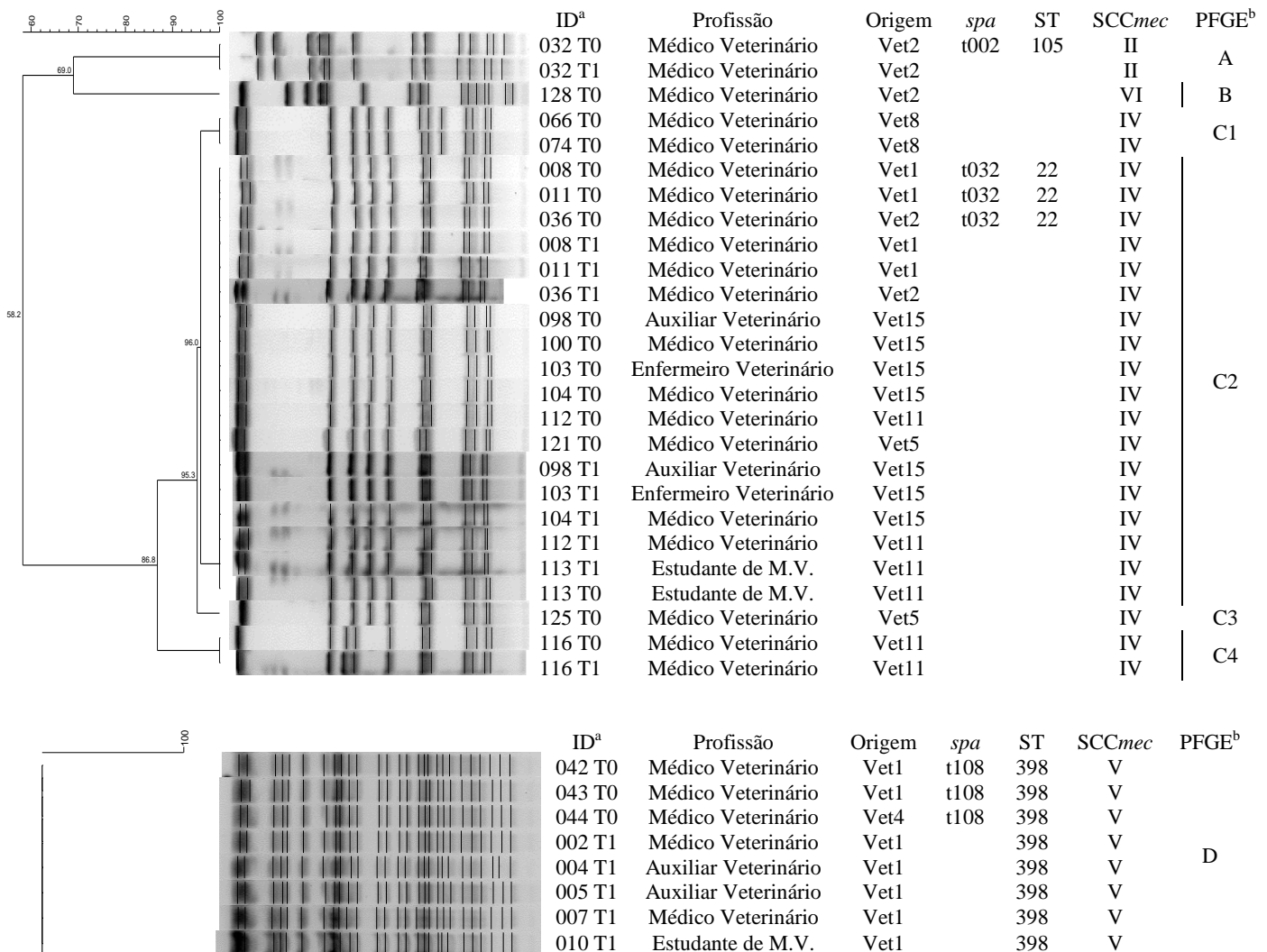
Gráfico 10 – Resultado da análise de seguimento.



Nestas 54 pessoas tinham sido isolados na primeira análise (T0) 45 estirpes MRSE, 14 estirpes MRSA, 7 estirpes MRSH, 3 estirpes de outros MR-CoNS e 2 estirpes MRSP (Tabela 9). De referir ainda que 40 pessoas tinham colonização simples e 14 co-colonização por ≥ 2 estirpes MRS. Das 7 pessoas que apresentaram colonização transitória, 3 tinham colonização simples por MRSE (ID 054, 077 e 086), 1 por MRSA (044), 1 por MRSH (034), 1 por outros MR-CoNS (012) e 1 apresentavam co-colonização por MRSE e MRSP (033) (Tabela 9). Apesar dos resultados presentes no Gráfico 10, a análise de PFGE foi essencial para diferenciar colonização persistente de re-colonização. Das pessoas que estavam inicialmente colonizadas por MRSA (n=14), na análise de seguimento esta espécie não foi detetada em 4 pessoas

(ID 042, 043, 044 e 128), sendo que uma (ID 044) deixou de estar colonizada por qualquer MRS (colonização transitória), enquanto as outras 3 apresentavam outra espécie de MRS já identificada em T0. As pessoas ID 042, 043 e 044 estavam colonizadas com o clone LA-MRSA em T0. Nas restantes pessoas, as estirpes MRSA encontradas tinham as mesmas características das estirpes iniciais (Tabela 9 e Figura 11), sugerindo uma verdadeira colonização prolongada. De referir ainda que o clone LA-MRSA ST398 foi identificado em 5 pessoas (ID 002, 004, 005, 007 e 010) apenas na análise de seguimento, tendo características idênticas (padrão de PFGE e tipo de SCCmec) às do clone LA-MRSA identificado em T0 (Tabela 9 e Figura 11). A maioria das pessoas (7 de 8) em que este clone foi identificado trabalhava no mesmo local, sendo que algumas tinham contacto com outra pessoa positiva para este clone.

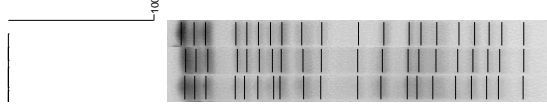
Figura 11 – Análise de PFGE das estirpes MRSA não ST398 (em cima) e MRSA ST398 (em baixo). ^aT0: 1^a análise, T1: análise de seguimento; ^bpadrões de PFGE: SA-A ao SA-D.



As únicas duas pessoas colonizadas com MRSP participaram neste estudo de seguimento, sendo que uma delas (ID 033) apresentou colonização transitória e a outra (ID 022) estava

colonizada por uma estirpe MRSP com as mesmas características da estirpe inicial (Tabela 9 e Figura 12), ou seja, manteve a colonização.

Figura 12 – Análise de PFGE das estirpes MRSP. ^aT0: 1^a análise, T1: análise de seguimento; ^bpadrões de PFGE:

SP-A.						
	ID ^a	Profissão	Origem	ST	SCC _{mec}	PFGE ^b
	022 T0	Estudante de M.V.	Vet2	71	II-III	SP-A
	022 T1	Estudante de M.V.	Vet2		II-III	
	033 T0	Estudante de E.V.	Vet2		II-III	

Relativamente às pessoas inicialmente colonizadas com MRSE (n=45), na análise de seguimento esta espécie não foi detetada em 6 pessoas, sendo que 4 (ID 033, 054, 077 e 086) deixaram de estar colonizadas por MRS, numa foi identificada uma espécie que não estava inicialmente presente (ID 010) e a outra apresentava outras espécies de MRS já identificadas em T0 (Tabela 9). Das restantes 39 pessoas em que o MRSE foi detetado, as estirpes encontradas em T1 tinham: i) um padrão de PFGE e tipo de SCC_{mec} idênticos aos das estirpes em T0 em apenas 14 pessoas, sugerindo colonização prolongada; ii) um padrão de PFGE idêntico ao das estirpes em T0, mas houve alteração do tipo de SCC_{mec} (NT para IV [n=3] e II para NT [n=1]) em 4 pessoas; iii) um padrão de PFGE similar (mesmo tipo, mas diferente subtipo) ao das estirpes em T0 em 10 pessoas (ID 002, 009, 035, 047, 048, 049, 053, 058, 110 e 113); e iv) um padrão de PFGE diferente do das estirpes em T0 nas outras 11 pessoas (Tabela 9 e Figura 13). Estas últimas 2 situações sugerem re-colonização pela mesma espécie. De referir ainda que houve uma pessoa (ID 116) em que foi identificada uma estirpe MRSE apenas no estudo de seguimento (Tabela 9).

No que diz respeito às pessoas inicialmente colonizadas com MRSH (n=7), em T1 esta espécie não foi detetada em 4 pessoas, sendo que uma deixou de estar colonizada por qualquer MRS (ID 034), enquanto as outras 3 apresentavam outra espécie de MRS já identificada em T0 (Tabela 9). Das restantes 3 pessoas em que o MRSH foi identificado, as estirpes encontradas em T1 tinham características idênticas (padrão de PFGE e tipo de SCC_{mec}) às estirpes iniciais em 2 pessoas (sugerindo colonização prolongada), enquanto na outra as estirpes em T0 e T1 eram diferentes (sugerindo re-colonização) (Tabela 9 e Figura 14). De referir ainda que em 2 pessoas (ID 101 e 105) foram identificadas estirpes MRSH apenas no estudo de seguimento (Tabela 9).

Figura 13 – Análise de PFGE das estirpes MRSE. ^aT0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^bpadrões de PFGE:

SE-A ao SE-G.

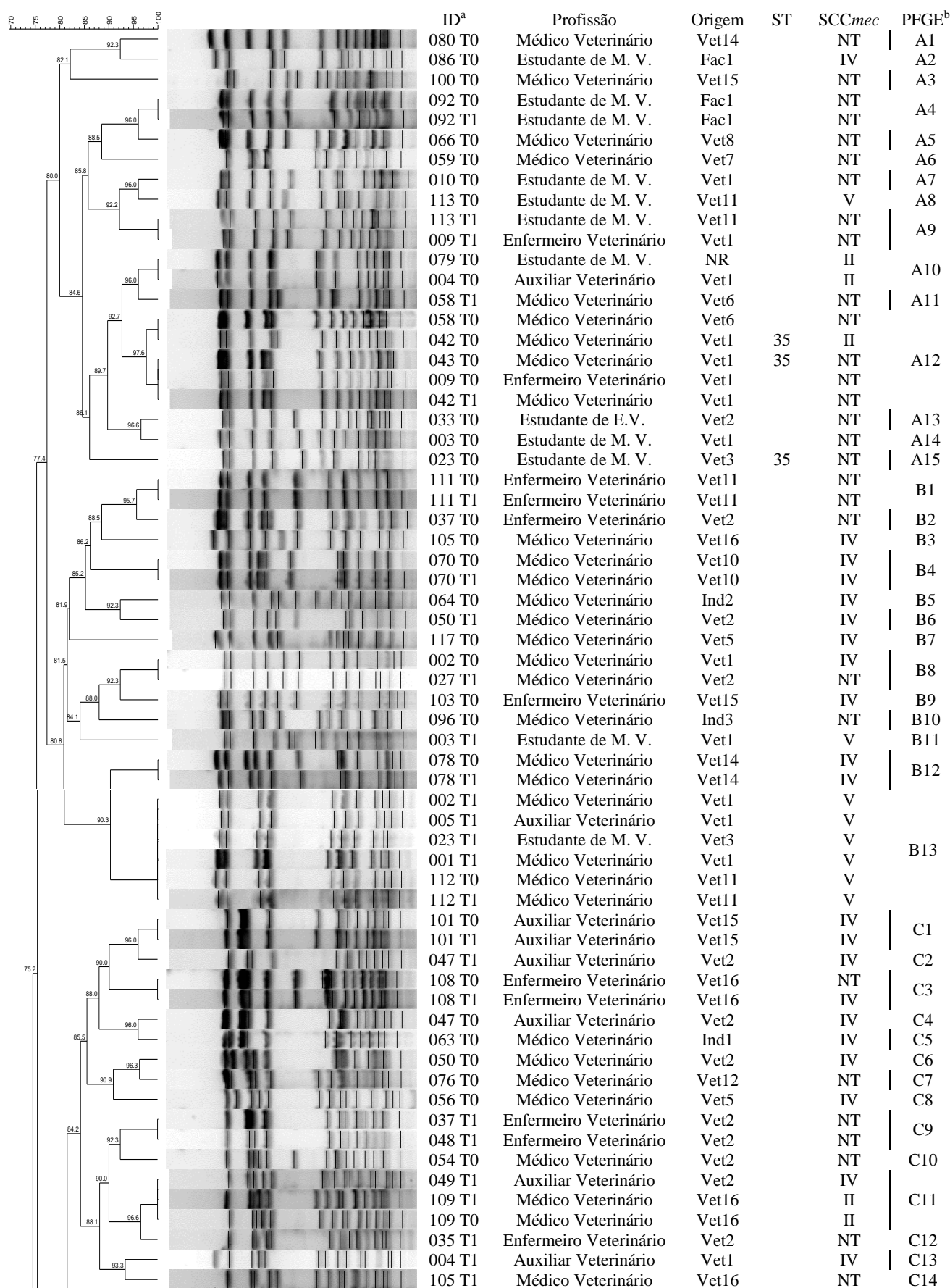
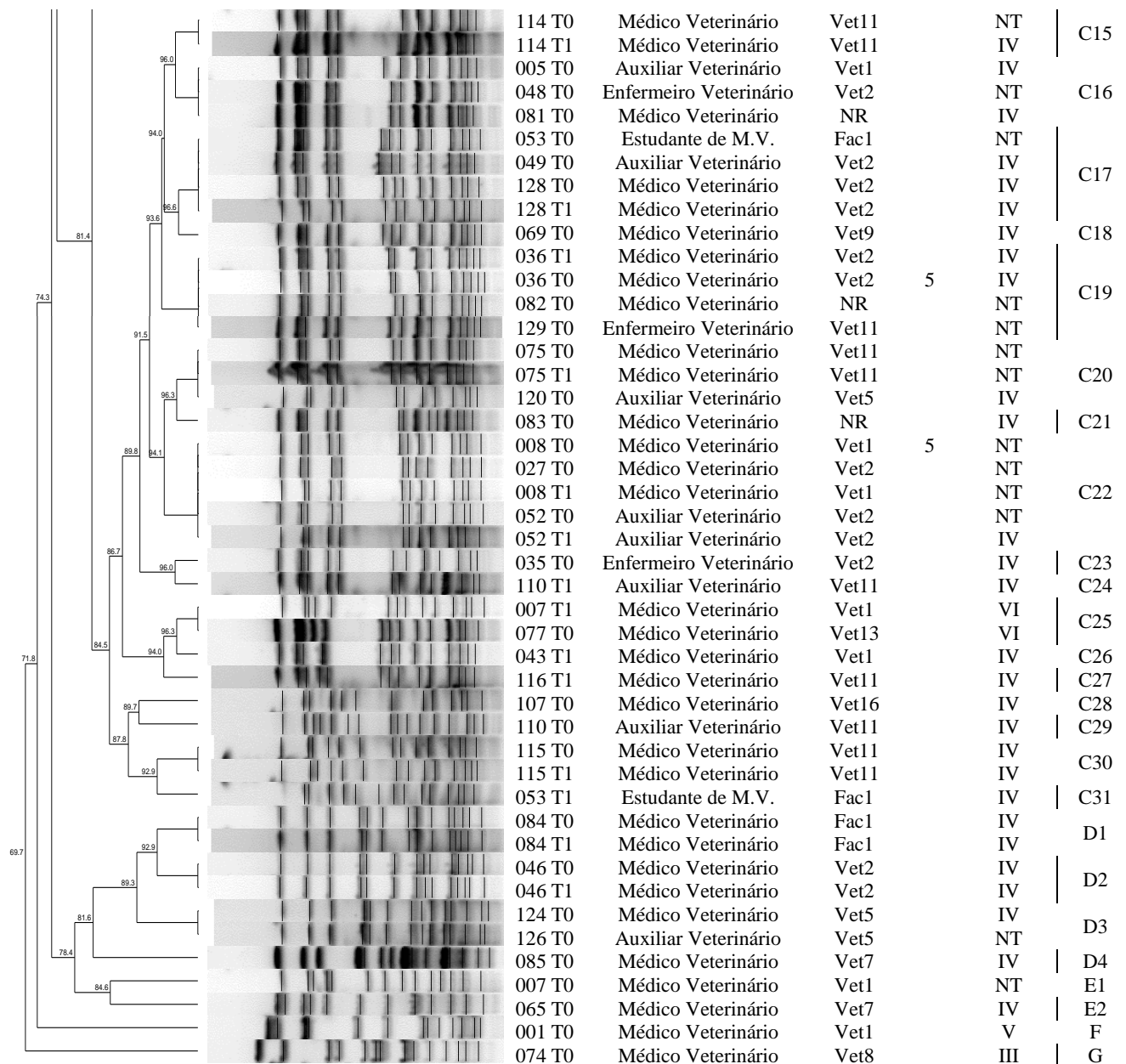
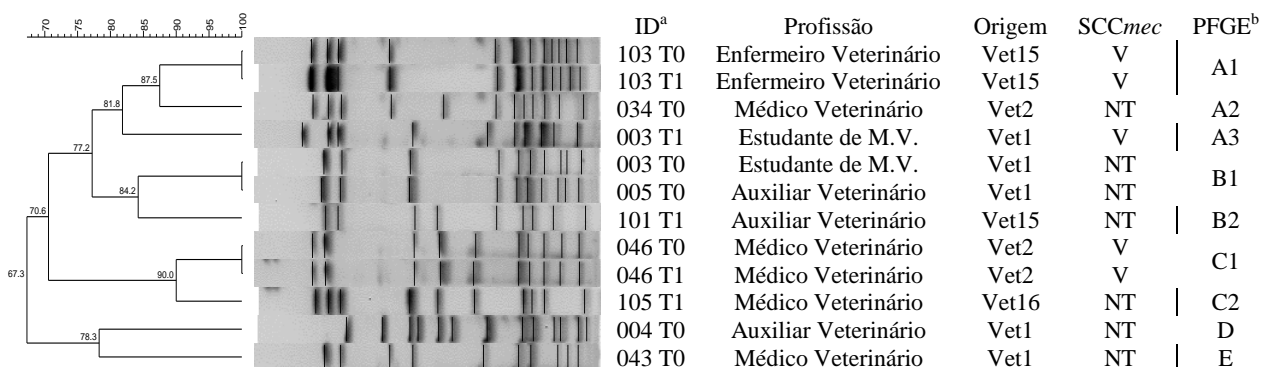


Figura 13 (continuação) – Análise de PFGE das estirpes MRSE. ^aT0: 1ª análise, T1: análise de seguimento;^bpadrões de PFGE: SE-A ao SE-G.**Figura 14** – Análise de PFGE das estirpes MRSH. ^aT0: 1ª análise, T1: análise de seguimento; ^bpadrões de

PFGE: SH-A ao SH-E.



6. DISCUSSÃO

De acordo com a bibliografia consultada, este é o primeiro estudo que avalia a prevalência de colonização por MRS em portadores humanos saudáveis em contacto diário profissional com animais, como médicos veterinários, enfermeiros, auxiliares e estudantes de Medicina Veterinária e Enfermagem Veterinária, em Portugal. A prevalência de colonização por MRS encontrada neste estudo (61%) é elevada, tendo sido identificados dois fatores de risco associados a colonização: i) ser profissional veterinário, comparativamente a ser estudante; e ii) ter contactado com um animal positivo para MRSA ou MRSP. O primeiro fator está também associado a colonização por MRSE e MRSA. O maior risco de colonização por MRS e, mais especificamente, MRSE e MRSA em médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares veterinários poderá ser explicado pela sua frequência e proximidade de contacto com cada paciente, quer seja em consulta, internamento ou cirurgia. Contudo, é importante referir que, dos 10 alunos colonizados, 8 estavam a realizar o estágio final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 1 estava no 4º ano e o estudante de enfermagem veterinária estava no 3º ano (último ano do curso), tendo, por isso, um importante contacto com animais. O fator ser profissional veterinário já tinha sido anteriormente identificado como fator de risco para colonização por MRSA (Ishihara et al., 2010). O contacto com animais positivos para MRSA também já tinha sido identificado como fator de risco para colonização por MRSA em veterinários de equinos (Anderson et al., 2008) e de animais de companhia (Ishihara et al., 2010), e também para colonização por MRSP (Ishihara et al., 2010). Se o contacto com animais positivos para MRSA ou MRSP está associado a colonização, tal poderá sugerir que estas pessoas adquiriram estas estirpes a partir dos animais. Tal situação já foi reportada por vários autores (Moodley et al., 2006; Pomba et al., 2009a; Pomba et al., 2010a). No entanto, estas pessoas colonizadas podem também transmitir MRS para os seus pacientes animais e para outras pessoas em risco elevado de desenvolver infeção por estes agentes patogénicos.

A frequência de colonização por MRSA (14,7%) encontrada neste estudo é bastante superior à observada em estudos anteriores em profissionais veterinários, cujas frequências de colonização variam entre 1% e 11,9%, dependendo do país e do tipo de prática clínica (Anderson et al., 2008; Moodley et al., 2008; Jordan et al., 2011; Paul et al., 2011; Wettstein Rosenkranz et al., 2014). Contudo, é comparável à observada num hospital veterinário no Japão em 2008 (15,1%), mas inferior à obtida nesse mesmo local no ano anterior (19,5%) (Ishihara et al., 2010). Em Portugal, esta frequência de colonização por MRSA é bastante superior à descrita em pessoas saudáveis na comunidade (<1% em colonização) (Sá-Leão et al., 2001; Tavares et al., 2010), mas bastante inferior à frequência de MRSA em infeções na comunidade (21,6% -

25,9%) (Espadinha et al., 2013; Tavares et al., 2013). Para além disto, a frequência de MRSA foi também superior à encontrada em profissionais de saúde em Medicina Humana (4,8%) (Amorim et al., 2009).

O clone EMRSA-15 foi o principal clone MRSA identificado neste estudo (10 pessoas, padrão C2 de PFGE) e outras 4 pessoas (padrões C1 [ID 066 e 074], C3 [125] e C4 [116]) estavam colonizadas por uma estirpe MRSA com um padrão de PFGE relacionado ao do clone EMRSA-15. Esta descoberta não é surpreendente, pois este é o clone dominante nos Hospitais de Medicina Humana e na comunidade em Portugal (Aires-de-Sousa et al., 2008; Espadinha et al., 2013; Tavares et al., 2013). Para além disso, este clone epidémico é também o predominantemente encontrado nos animais de companhia (Coelho et al., 2011; Couto et al., 2011; Couto et al., 2012a) e já foi anteriormente detetado num médico veterinário em Portugal (Pomba et al., 2009a). A presença do clone EMRSA-15 em profissionais veterinários de clínicas/hospitais veterinários diferentes sugere que este clone poderá estar disseminado nos profissionais veterinários, na população animal e no ambiente das clínicas/hospitais veterinários. Por outro lado, foram identificados 3 clones diferentes em pessoas do mesmo hospital veterinário sugerindo exposição a diferentes fontes de MRSA. O segundo clone mais prevalente corresponde ao clone LA-MRSA ST398. Este clone não só coloniza os animais de produção, como é capaz de passar a barreira das espécies, resultando em transmissão zoonótica para as pessoas com exposição a animais de produção. Em Portugal, este clone já foi detetado em colonização nasal em suínos e em pessoas expostas a estes (Pomba et al., 2009b; Pomba et al., 2010a), bovinos (Couto et al., 2014a) e cavalos (Couto et al., 2012b), já tendo sido descrito num animal de companhia (Couto, Belas, Kadlec, Schwarz & Pomba, submetido). Neste estudo, este clone foi detetado em pessoas que trabalham com animais de companhia, não tendo sido possível averiguar se tiveram contacto recente com animais de produção. No entanto, as estirpes LA-MRSA deste estudo têm características idênticas (tipo *spa* t108 e *SCCmec* V) às reportadas por Couto e colegas (2014a) em bovinos e suínos (Couto et al., submetido). Foi também identificado o clone relacionado ao Nova Iorque/Japão (ST105-t002-II), pertencente ao CC5. Este CC5 tem sido identificado numa proporção significativa de estirpes MRSA em ambiente hospitalar (Espadinha et al., 2013). Para além disso, a estirpe isolada neste estudo apresenta características idênticas à primeira estirpe VRSA identificada em infeção em Portugal (Melo-Cristino et al., 2013; Friães et al., 2014), contudo o gene *vanA* não foi identificado. Estirpes MRSA pertencentes ao CC5 também já foram identificadas em animais de companhia (MRSA ST105-t002-II e ST5-t311-VI) e cavalos (MRSA ST5-t062-VI) (Couto et al., 2012a; Couto et al., 2012b; Couto et al., submetido).

A frequência de colonização por MRSP (1,6%) encontrada neste estudo é consideravelmente baixa, comparável à observada em estudos anteriores em profissionais veterinários (0%-3,9%) (Ishihara et al., 2010; Paul et al., 2011; Wettstein Rosenkranz et al., 2014), mas bastante inferior à obtida num hospital veterinário no Japão em 2008 (7,9%) (Ishihara et al., 2010). As estirpes MRSP identificadas correspondem ao principal clone emergente nos animais de companhia na Europa (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010) e, mais especificamente, em Portugal (Couto et al., 2011; Couto et al., 2014b). A rápida disseminação do clone MRSP ST71 é preocupante, dado o perfil de multirresistência frequentemente apresentado pelo mesmo (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010; Couto et al., 2011; Paul et al., 2011; Couto et al., 2014b). Surpreendentemente, as estirpes MRSP foram identificadas em estudantes a estagiar no mesmo local, sugerindo exposição a uma mesma fonte e, como não foram detetadas em profissionais veterinários a trabalhar no mesmo local, sugere que estes ou não estiveram expostos a essa mesma fonte ou eventualmente deixaram de estar colonizados antes da sua participação neste estudo.

No que diz respeito aos MR-CoNS, foi encontrada uma frequência de colonização por MRSE de 52,7% e de MRSH de 5,4%. Estudos realizados na população em geral encontraram frequências de colonização por MR-CoNS de 50,6% em 2006 e de 46,8% em 2008, tendo o MRSE sido o mais frequente, seguido do MRSH (Lebeaux et al., 2012). Num estudo realizado em pessoas em contacto com cavalos foi encontrada uma prevalência de MR-CoNS de 63%, contudo a espécie mais prevalente foi *S. vitulinus*, seguida de *S. haemolyticus* (Moodley & Guardabassi, 2009a). A prevalência de MRSE encontrada neste estudo é bastante superior à observada por Rolo e colegas (2012) na comunidade (7%) e em ambiente hospitalar (30%) em Portugal.

A predominância de *S. epidermidis* entre as estirpes MRS não é inesperada, dado que esta é a espécie de CoNS mais frequente no Homem (Becker et al., 2014b). À semelhança do observado noutros estudos (Miragaia et al., 2002; Miragaia et al., 2007; Rolo et al., 2012), as estirpes MRSE identificadas neste estudo apresentam uma enorme diversidade genética. As ST identificadas (ST5 e ST35) pertencem ao CC5, já previamente identificado como predominante nos Hospitais de Medicina Humana e na comunidade em Portugal (Rolo et al., 2012). Para além disso, este CC, mais especificamente a ST5, já foi também identificado em animais de companhia na Suíça (Kern & Perreten, 2013) e Alemanha (Weiß et al., 2013). Nos animais de companhia em Portugal, ambas as ST foram identificadas (Couto et al., submetido; Couto et al., resumo aceite; Anexo 5). A análise de PFGE permitiu verificar que a população de MRSE identificada em pessoas que trabalham na mesma clínica/hospital veterinário é bastante diversa, tendo contudo sido identificados alguns clones comuns a várias pessoas. Para além disso, a

identificação de vários clones MRSE em profissionais veterinários de diversos locais, sugere uma disseminação dos mesmos nas pessoas e eventualmente na população animal e no ambiente das clínicas/hospitais veterinários. Ao investigarem a distribuição de estirpes MRS numa clínica veterinária, Weiß e colegas (2013) detetaram várias estirpes MRSE com características moleculares indistinguíveis em animais hospitalizados, trabalhadores e amostras do ambiente (como mantas e pratos de comida), realçando o papel que os animais, profissionais veterinários e o ambiente têm na disseminação de estirpes MRS em clínicas/hospitais veterinários.

No que diz respeito ao MRSH, a inexistência de um protocolo MLST com bom poder discriminatório e de uma base de dados mundial acessível aos investigadores impossibilita a comparação das estirpes obtidas neste estudo com outros (Moodley & Guardabassi, 2009a; Kern & Perreten, 2013; McManus et al., 2014). Contudo, em estudos recentes com isolados animais e humanos, foram identificadas, por PFGE, isolados MRSH geneticamente relacionados em ambos os hospedeiros (McManus et al., 2014; Couto et al., submetido; Couto et al., resumo aceite; Anexo 5). Também Moodley & Guardabassi (2009a) detetaram um clone de MRSH disseminado em vários cavalos, pessoas e ambiente de um hospital veterinário. De uma maneira geral, a população de MRSH obtida de pessoas que trabalham na mesma clínica/hospital veterinário é diversa, tendo contudo sido identificado um clone comum a 2 pessoas que trabalhavam no mesmo local.

Os MR-CoNS têm sido referidos como importantes reservatórios de *SCCmec* para espécies de staphylococci clinicamente mais importantes, como *S. aureus* (Shore & Coleman, 2013; Becker et al., 2014b). A identificação, neste estudo, de uma maior variedade de tipos de *SCCmec* em MR-CoNS comparativamente aos MR-CoPS reflete a enorme diversidade observada nos primeiros e contribui para a hipótese de estas estirpes serem um grande reservatório deste elemento genético para outras espécies de staphylococci. Quase metade (48%) das estirpes de MR-CoNS apresentava um *SCCmec* NT, com uma nova associação entre complexo de gene *ccr* e complexo de gene *mec* (13%) ou complexo de gene *ccr* e/ou *mec* não detetáveis (53%) ou múltiplos tipos de *ccr* (34%) (Figura 10). É possível que a presença de múltiplos tipos de *ccr* seja devido a uma falta de especificidade dos oligonucleótidos usados, com amplificação de vários fragmentos de ADN a partir de um único tipo de *ccr*. Contudo, em todas as estirpes com múltiplos tipos de *ccr* (exceto 5 estirpes), os fragmentos amplificados apresentavam bandas cujo tamanho correspondia ao das estirpes de referência usadas no protocolo. A identificação de estirpes MR-CoNS com *SCCmec* NT, por razões semelhantes às identificadas neste estudo, tem sido reportada por vários autores (Bouchami et al., 2012; Lebeaux et al., 2012; Rolo et al., 2012; Paul et al., 2014), enfatizando a necessidade de realização de mais estudos em MR-CoNS dada a frequência de aparecimento de novas cassetes e estabelecimen-

to de um sistema de classificação do *SCCmec* direcionado para este grupo. À semelhança de outros estudos (Bouchami et al., 2012; Lebeaux et al., 2012; Rolo et al., 2012; Kern & Perreten, 2013; Weiß et al., 2013; Paul et al., 2014), o *SCCmec* IV foi o mais frequente nas estirpes MRSE, enquanto nas estirpes MRSH, para além do *SCCmec* NT, o *SCCmec* V foi o único identificado, sugerindo que estas espécies são importantes reservatórios destes tipos de cassetes.

Uma percentagem considerável de pessoas (23%) estava colonizada, simultaneamente, por múltiplas espécies de MRS, sendo que, na maioria delas, as várias espécies encontradas em cada pessoa tinham diferentes tipos de *SCCmec*. Contudo, em 2 pessoas as espécies de MRS identificadas partilhavam o mesmo tipo de *SCCmec*. Estas 2 pessoas estavam colonizadas por: i) MRSA e MRSE com *SCCmec* IV (ID 036); e ii) MRSA, MRSE e MRSH, sendo que as duas primeiras estirpes tinham o mesmo tipo de *SCCmec* (IV), o qual é diferente do apresentado pelo MRSH (*SCCmec* V) (ID 103). Faria e colegas (2014) detetaram co-colonização nasal por diferentes espécies de MRS em duas pessoas, mas as espécies encontradas em cada uma tinham diferentes tipos de *SCCmec*. Estes autores sugeriram que o *SCCmec* não era facilmente transferido entre diferentes espécies de staphylococci neste nicho ecológico, mas sim adquirido por elas antes da colonização; alternativamente, a transferência podia ocorrer na cavidade nasal, mas o dador ou recetor seria rapidamente eliminado deste habitat, não sendo detetado pela metodologia usada.

A maioria das pessoas que participaram no estudo de seguimento continuava colonizada, ao fim de 1 a 4 meses, por, pelo menos, uma das espécies de MRS presentes inicialmente. No caso das estirpes MRSA, verificou-se persistência de colonização pelo clone EMRSA-15 e clones relacionados ao EMRSA-15 e ao Nova Iorque/Japão, enquanto no caso do clone LA-MRSA ST398 a colonização foi transitória. Estes resultados sugerem uma maior capacidade de colonização humana a longo prazo pelos primeiros comparativamente ao clone LA-MRSA ST398. Tal poderá estar relacionado com a descoberta feita por Price e colegas (2012) de que as estirpes de *S. aureus* CC398 associadas a animais de produção perderam o fago que contém genes importantes para colonização humana. Contudo, a presença destes genes nas estirpes LA-MRSA não foi avaliada neste estudo.

No caso das estirpes MRSP, apenas se verificou persistência de colonização pelo clone ST71 numa pessoa. A outra pessoa (033) estava colonizada de forma transitória, sendo que tal poderá ser por ter deixado de estar exposta a animais potencialmente colonizados/infetados ou a colonização não ter sido detetada pela metodologia usada. Contudo, nesta pessoa não foram detetados nenhuns dos MRS iniciais. Considerando que o Homem não é o hospedeiro natural desta espécie (Bond & Loeffler, 2012), a deteção de colonização persistente pelo mesmo clo-

ne sugere uma capacidade de adaptação do mesmo a este hospedeiro. A capacidade de o MRSP ST71 colonizar de forma persistente, ao longo de 1 mês, veterinários já tinha sido reportada por Paul e colegas (2011).

Relativamente às estirpes MRSE, verificou-se que 39 pessoas estavam persistentemente colonizadas por esta espécie de staphylococci. Contudo, a análise de PFGE e tipagem SCC*mec* permitiu concluir que, na realidade, apenas 14 pessoas mantiveram a estirpe MRSE inicial, sendo que noutras 4 a estirpe encontrada em T1 tinha um padrão de PFGE indistinguível da inicial, mas SCC*mec* diferente. Em 3 destas 4 pessoas, as estirpes em T0 tinham um SCC*mec* NT porque o complexo do gene *mec* não foi detetado, o qual poderá dever-se a algum erro durante a realização do protocolo, mas tinham o *ccrA2B2*, o qual aparece em SCC*mec* do tipo II e IV; no entanto, na outra pessoa a estirpe em T1 tinha um SCC*mec* NT porque apresentava múltiplos tipos de *ccr*, sugerindo eventualmente aquisição de uma nova cassette numa estirpe com características idênticas à inicial. No que diz respeito às estirpes MRSH, 2 das 3 pessoas persistentemente colonizadas mantiveram a estirpe inicial, enquanto a outra adquiriu uma estirpe distinta. Resultados semelhantes foram também observados por Lebeaux e colegas (2012) num estudo longitudinal sobre colonização nasal por MR-CoNS: nenhuma das pessoas persistentemente colonizadas por MRSE, MRSH e *S. hominis* metilina-resistente apresentou a mesma estirpe em dois momentos temporais. Estes resultados sugerem que a colonização persistente por MR-CoNS parece resultar de uma aquisição sucessiva de estirpes distintas a partir do ambiente ou evolução de uma população já estabelecida e não uma verdadeira colonização prolongada pela mesma estirpe, sendo que esta última situação parece apresentar uma baixa frequência de ocorrência.

Existem algumas limitações que podem ser apontadas neste estudo. As zaragatoas nasais foram colhidas pelos próprios participantes, sob supervisão do autor e após explicação do modo de colheita, contudo a variação inerente à colheita pode ter influenciado a deteção de MRS em alguns participantes. Para além disto, na maior parte das pessoas, a zaragatoa foi colhida durante o turno de trabalho, o qual pode também ter influenciado a frequência de colonização. Idealmente, a colheita deveria ter sido realizada antes do turno de trabalho. E ainda, não foi possível realizar o estudo de seguimento a todas as pessoas positivas para MRS, o qual poderia eventualmente alterar a frequência de colonização persistente.

7. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A resistência à metilicina em staphylococci é de grande preocupação para a saúde pública e animal. Perante este facto, foi realizado o presente estudo para verificar se, à semelhança do observado noutros países, os profissionais veterinários em Portugal também apresentam elevadas frequências de colonização eventualmente associadas a exposição ocupacional. Neste estudo, observou-se uma elevada prevalência de colonização por MRS (61%) e foram identificados clones tipicamente presentes em animais. Para além disso, a identificação, neste estudo, de que ser profissional veterinário (médico veterinário, enfermeiro e auxiliar veterinário) e contactar com animais positivos para MRSA ou MRSP estão associados a colonização por estes agentes patogénicos apoia a possibilidade de exposição ocupacional. Entre os clones MRS identificados, a deteção do clone LA-MRSA ST398 em profissionais veterinários que contactam com animais de companhia foi inesperada, dado que este clone é mais frequentemente encontrado em pessoas com exposição a animais de produção.

Este estudo é também um dos poucos que avalia a dinâmica de colonização nasal, a longo prazo, por MRS em profissionais veterinários. Tal permitiu verificar que a maioria das pessoas colonizadas (85%) manteve a colonização por um período de 1 a 4 meses, tendo-se verificado duas situações distintas: no caso das estirpes MRSA e MRSP, as pessoas apresentavam uma colonização persistente pela mesma estirpe, enquanto no caso dos MR-CoNS, a colonização persistente deveu-se maioritariamente a uma aquisição sucessiva de estirpes distintas. Contudo, são necessários mais estudos longitudinais para verificar se estes são resultados constantes.

A identificação dos mesmos clones em pessoas que trabalhavam no mesmo local e mesmo entre pessoas de locais diferentes sugere uma disseminação dos mesmos. Para além disso, no caso dos MR-CoNS, a identificação de múltiplas estirpes distintas em pessoas que trabalhavam no mesmo local sugere exposição a múltiplas fontes, como as pessoas que trabalham com animais, o ambiente, os próprios animais e os seus donos. Teria, por isso, sido interessante investigar a presença de MRS nas próprias clínicas/hospitais veterinários com uma pesquisa simultânea em trabalhadores, animais e ambiente por forma a identificar os possíveis reservatórios. Estudos deste género são particularmente necessários em MR-CoNS dada a escassez de estudos em Medicina Veterinária em Portugal, e por estes serem considerados reservatórios de SCCmec para espécies de staphylococci clinicamente mais importantes. Além disso, algumas espécies de CoNS são uma importante causa de infeções nosocomiais associadas a dispositivos médicos em Medicina Humana, sendo por isso necessário avaliar o papel dos animais como reservatório deste grupo de staphylococci.

Para terminar, os resultados presentes neste estudo devem sensibilizar a comunidade Médico-Veterinária para a presença de MRS na prática clínica, o uso prudente de antibióticos e a necessidade de implementar medidas de prevenção e controlo de infeção para minimizar a disseminação destes agentes patogénicos a partir de animais portadores para profissionais veterinários e vice-versa.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aires-de-Sousa, M., Correia, B., de Lencastre, H. & Multilaboratory Project Collaborators. (2008). Changing Patterns in Frequency of Recover of Five Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Portuguese Hospitals: Surveillance over a 16-Year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 2912-2917.
- Amorim, M.L., Vasconcelos, C., Oliveira, D.C., Azevedo, A., Calado, E., Faria, N.A., Pereira, M., Castro, A.P., Moreira, A., Aires, E., Cabeda, J.M., Ramos, M.H., Amorim, J.M. & de Lencastre, H. (2009). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal colonization among patients and healthcare workers in a Portuguese hospital: a pre-intervention study toward the control of MRSA [Abstract]. *Microbial Drug Resistance*, 15(1), 19-26.
- Anderson, M.E., Lefebvre, S.L. & Weese, J.S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Veterinary Microbiology*, 129, 410-417.
- Bannoehr, J., Zakour, N.L.B., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H.M. & Fitzgerald, J.R. (2007). Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8685-8692.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. & Kriegeskorte, A. (2014a). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 794-804.
- Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. (2014b). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926.
- Blaiotta, G., Casaburi, A. & Villani, F. (2005). Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of *sodA* genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(6), 519-526.
- Bond, R. & Loeffler, A. (2012). What’s happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *Journal of Small Animal Practice*, 53(3), 147–154.
- Bouchami, O., Ben Hassen, A., de Lencastre, H. & Miragaia, M. (2012). High prevalence of *mec* complex C and *ccrC* is independent of SCC*mec* type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 605-614.
- Carriço, J.A., Pinto, F.R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N.G., Frazão, N., de Lencastre, H. & Almeida, J.S. (2005). Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5483–5490.
- Catry, B., van Duijkeren, E., Pomba, C., Greko, C., Moreno, M.A., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Ungemach, F., Törneke, K., Munoz-Maduro, C. & Torren-Edo, J. on behalf of the Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM) (2010). Reflection paper on MRSA in food-producing and companion ani-

- mals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiology & Infection*, 138, 626-644.
- Cavanagh, J.P., Klingenberg, C., Hanssen, A.M., Fredheim, E.A., François, P., Schrenzel, J., Flaegstad, T. & Sollid, J.E. (2012). Core genome conservation of *Staphylococcus haemolyticus* limits sequence based population structure analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 89, 159-166.
- Chen, L.F. (2013). The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a superbug. *American Journal of Infection Control*, 41, 448-451.
- Chuang, C.Y., Yang, Y.L., Hsueh, P.R. & Lee, P.L. (2010). Catheter-Related Bacteremia Caused by *Staphylococcus pseudintermedius* Refractory to Antibiotic-Lock Therapy in a Hemophilic Child with Dog Exposure. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1497-1498.
- Coelho, C., Torres, C., Radhouani, H., Pinto, L., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Zaragaza, M., Igrejas, G. & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs in Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 333-337.
- Conceição, T., Aires-de-Sousa, M., Pona, N., Brito, M.J., Barradas, C., Coelho, R., Sardinha, T., Sancho, L., de Sousa, G., Machado, M.C. & de Lencastre, H. (2011). High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children [Abstract]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(2), 293-297.
- Conceição, T., Diamantino, F., Coelho, C., de Lencastre, H. & Aires-de-Sousa, M. (2013). Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: A Possible Transmission Route of Major MRSA Clones within the Community. *PLoS One*, 8(11), e77812.
- Concord (2013). Final Report – CONCORD (Control of community-acquired MRSA: rationale and development of counteractions). European Commission.
- Couto, N., Belas, A. & Pomba, C. (2012a). Clonality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy and sick companion animals and humans in Portugal. In *Proceedings of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), London, UK, 2012*. Abstract 1316. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
- Couto, N., Belas, A., Centeno, M., van Duijkeren, E. & Pomba, C. (2014a). First description of *fexA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from calves in Portugal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2 (4), 342-343.
- Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V. & Pomba, C. (2014b). Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 20(4), 364-371.
- Couto, N., Belas, A., Kadlec, K., Schwarz, S. & Pomba, C. (2015). Clonal diversity, virulence, antimicrobial and biocide susceptibility patterns among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Artigo submetido.

- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*, 169(3), 1-2.
- Couto, N., Tilley, P., Simões, J., Sales Luís, J.P. & Pomba, C. (2012b). First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST5 and ST398 from Purebred Lusitano Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(5), 300-304.
- Cuny, C., Layer, F., Strommenger, B. & Witte, W. (2011). Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany, *PLoS One*, 6(9), e24360.
- Descloux, S., Rossano, A. & Perreten, V. (2008). Characterization of New Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) and Topoisomerase Genes in Fluoroquinolone- and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1818-1823.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1569–1573.
- Devriese, L.A., Van Damme, L.R. & Famaree, L. (1972). Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Bovine Mastitis Cases [Abstract]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 19(7), 598–605.
- EFSA (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 – Part A: MRSA prevalence estimates. *EFSA Journal*, 7(11), 1376-1457.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J. & Spratt, B.G. (2000). Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008-1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. & Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7687-7692.
- Espadinha, D., Faria, N.A., Miragaia, M., Lito, L.M., Melo-Cristino, J., de Lencastre, H. & Médicos Sentinela Network. (2013). Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. *PLoS One*, 8(4), e59960.
- EURL-AR. Laboratório de Referência da União Europeia em Resistência Antimicrobiana. Acedido em Abril 19, 2014. Disponível em: <http://www.crl-ar.eu/143-introduction.htm>
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.
- Faria, N.A., Carriço, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M. & de Lencastre, H. (2008). Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and

- methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 136-144.
- Faria, N.A., Conceição, T., Miragaia, M., Bartels, M.D., de Lencastre, H. & Westh, H. (2014). Nasal carriage of Methicillin Resistant Staphylococci. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 1-10.
- Feßler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S. & Schwarz, S. (2010a). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 619-625.
- Feßler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K. & Schwarz, S. (2010b). Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1576-1582.
- Friães, A., Resina, C., Manuel, V., Lito, L., Ramirez, M. & Melo-Cristino, J. (2014). Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiology & Infection*, 5, 1-4.
- García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J. & Holmes, M.A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 595–603.
- Garcia-Graells, C., Antoine, J., Larsen, J., Catry, B., Skov, R. & Denis, O. (2012). Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiology & Infection*, 140, 383-389.
- Gillaspy, A.F. & Iandolo, J.J. (2009). *Staphylococcus*. In Schaechter, M. *Encyclopedia of Microbiology* (3th edition). (pp. 293-303). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Hanselman, B.A., Kruth, S.A., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Canadian Veterinary Journal*, 50 (9), 954–958.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 4961-4967.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2013). Acedido em Outubro 4, 2014. Disponível em: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html
- Ishihara, K., Shimokubo, N., Sakagami, A., Ueno, H., Muramatsu, Y., Kadosawa, T., Yanagisawa, C., Hanaki, H., Nakajima, C., Suzuki, Y. & Tamura, Y. (2010). Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 5165-5174.
- Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T.G., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B.,

- Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John Jr., J.F., Daum, R., Soderquist, B. & Buisson, G. (2012). International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (10), 4997–4999.
- Jordan, D., Simon, J., Fury, S., Moss, S., Giffard, P., Maiwald, M., Southwell, P., Barton, M.D., Axon, J.E., Morris, S.G. & Trott, D.J. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 89(5), 152-159.
- Kadlec, K. & Schwarz, S. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 276–e55.
- Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rossano, A. & Guardabassi, L. (2010). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1826-1837.
- Kania, S.A., Eberlein, L.C., Black, C.C., Solyman, S., Ofori, M.N. & Bemis, D.A. (2009). Staphylococcal cassette chromosome (SCC_{mec}): evidence of recent transfer from *Staphylococcus aureus* to *Staphylococcus pseudintermedius*. In *Proceedings of the ASM/ESCMID Conference on Methicillin-Resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, London, UK, 2009*. Abstract S5:3. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Kern, A & Perreten, V. (2013). Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(6), 1256-1266.
- Khanna, T., Friendship, R., Dewey, C. & Weese, J.S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology*, 128, 298-303.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J. & Hiramatsu, K. (2007). Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 264-274.
- Lebeaux, D., Barbier, F., Angebaut, C., Benmahdi, L., Ruppé, E., Felix, B., Gaillard, K., Djossou, F., Epelboin, L., Dupont, C., Renard, M., Peroz, G., Vandenesch, F., Wolff, M., Andremon, A. & Ruimy, R. (2012). Evolution of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in a Remote Population. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 315-323.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M., Gauduchon, V., Vandenesch, F. & Etienne, J. (1999). Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1128-1132.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M., Winkler, M., Weiss, R. & Lloyd, D.H. (2007). First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus in-*

- termedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18(6), 412-421.
- McManus, B.A., Coleman, D.C., Deasy, E.C., Brennan, G.I., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., Leggett, B. & Shore, A.C. (2014). Comparison of SCCmec, antimicrobial resistance genes and clonal lineages of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* from humans and companion animals. In *Proceedings of the 16th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Chicago, USA, 2014*. Abstract 157.
- Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L. & Ramirez, M. (2013). First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet*, 382(9888), 205.
- Miragaia, M., Couto, I., Pereira, S.F.F., Kristinsson, K.G., Westh, H., Jarlöv, J.O., Carriço, J., Almeida, J., Santos-Sanches, I. & de Lencastre, H. (2002). Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clones: Evidence of Geographic Dissemination. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 430-438.
- Miragaia, M., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C. & de Lencastre, H. (2007). Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2540-2552.
- Moodley, A. & Guardabassi, L. (2009a). Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities. *Veterinary Microbiology*, 137, 397-401.
- Moodley, A., Nightingale, E.C., Stegger, M., Nielsen, S.S., Skov, R.L. & Guardabassi, L. (2008). High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 34(2), 151-157.
- Moodley, A., Stegger, M., Bagcigil, A.F., Baptiste, K.E., Loeffler, A., Lloyd, D.H., Williams, N.J., Leonard, N., Abbott, Y., Skov, R. & Guardabassi, L. (2006). *spa* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1118-1123.
- Moodley, A., Stegger, M., Zakour, N.L.B., Fitzgerald, J.R. & Guardabassi, L. (2009b). Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, 135, 320-326.
- Morot-Bizot, S.C., Talon, R. & Leroy, S. (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1087-1094.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Solh, N.E., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Coombes, G. & Cookson, B. (2003). Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1574-1585.

- Nazareth, R., Gonçalves-Pereira, J., Tavares, A., Miragaia, M., de Lencastre, H., Silvestre, J., Freitas, P., Gonçalves, E., Martins, F., Mendes, V., Tapadinhas, C. & Póvoa, P. (2012). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 18(1), 34–38.
- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I.F., Verspohl, J., Gerlach, G.F., Schwarz, S., Simon, D. & Nolte, I. (2009). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(3), 660-662.
- Nouwen, J.L., Ott, A., Kluytmans-Vandenbergh, M.F.Q., Boelens, H.A.M., Hofman, A., van Belkum, A. & Verbrugh, H.A. (2004). Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a “culture rule”. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 806–811.
- Otter, J.A. & French, G.L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 227-239.
- Otter, J.A. & French, G.L. (2011). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 79, 189-193.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555–567.
- Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: What makes them special? *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 324-330.
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, 3, 127, 1-12.
- Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N. & Holmes, M.A. (2012). The newly described *mecA* homologue, *mecA_{LGA251}*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2809-2813.
- Paul, N.C., Moodley, A., Ghibaudo, G. & Guardabassi, L. (2011). Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Small Animal Veterinarians: Indirect Evidence of Zoonotic Transmission. *Zoonoses and Public Health*, 58(8), 533-539.
- Pereira, E.M., Schuenck, R.P., Malvar, K.L., Iorio, N.L.P., Matos, P.D.M., Olendzki, A.N., Oelemann, W.M.R & dos Santos, K.R.N. (2010). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiological Research*, 165, 243-249.
- Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rossano, A. & Guardabassi, L. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1145–1154.

- Piette, A. & Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, 134, 45-54.
- Pomba, C., Baptista, F.M., Couto, N., Loução, F. & Hasman, H. (2010a). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates with indistinguishable *ApaI* restriction patterns in colonized and infected pigs and humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(11), 2479-2481.
- Pomba, C., Couto, N. & Moodley, A. (2010b). Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(10), 802–6.
- Pomba, C., Hasman, H., Cavaco, L., Couto, N. & Aarestrup, F. (2009a). First description of an MRSA skin infection in a dog and attending veterinarian in Portugal. In *Proceedings of the ASM/ESCMID Conference on Methicillin-Resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, London, UK, 2009*. Abstract 21A. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Pomba, C., Hasman, H., Cavaco, L.M., da Fonseca, J.D. & Aarestrup, F.M. (2009b). First description of MRSA CC30 and CC398 from swine in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 193–194.
- Poulsen, A.B., Skov, R. & Pallesen, L.V. (2003). Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 419-421.
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P.S., Pearson, T., Waters, A.E., Foster, J.T., Schupp, J., Gillece, J., Driebe, E., Liu, C.M., Springer, B., Zdovc, I., Battisti, A., Franco, A., Zmudzki, J., Schwarz, S., Butaye, P., Jouy, E., Pomba, C., Porrero, M.C., Ruimy, R., Smith, T.C., Robinson, D.A., Weese, J.S., Arriola, C.S., Yu, F., Laurent, F., Keim, P., Skov, R. & Aarestrup, F.M. (2012). *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *MBio*, 3(1), e00305-11.
- Riegel, P., Jesel-Morel, L., Laventie, B., Boisset, S., Vandenesch, F. & Prévost, G. (2011). Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 237-239.
- Rolo, J., Miragaia, M. & de Lencastre, H. (2012). Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1333-1341.
- Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Semmler, T., Wleklinski, C.G., Paasch, A., Soba, A., Stamm, I., Kopp, P., Wieler, L.H. & Walther, B. (2010). Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 340–346.
- Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Wleklinski, C.G., Soba, A., Wieler, L.H. & Walther, B. (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 197–201.
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J.M., Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., on behalf of the European Society for Clinical Microbiology and

- Infectious Diseases (ESCMID) Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM) (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4), 1-15. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20380>
- Sá-Leão, R., Sanches, I.S., Couto, I., Alves, C.R. & de Lencastre, H. (2001). Low prevalence of methicillin-resistant strains among *Staphylococcus aureus* colonizing young and healthy members of the community in Portugal [Abstract]. *Microbial Drug Resistance*, 7(3), 237-245.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (3), 765-769.
- Savini, V., Barbarini, D., Polakowska, K., Gherardi, G., Bialecka, A., Kasproicz, A., Polilli, E., Marrollo, R., Di Bonaventura, G., Fazii, P., D'Antonio, D., Miedzobrodzki, J. & Carretto, E. (2013). Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1636-1638.
- Scott, G.M., Thomson, R., Malone-Lee, J. & Ridgway, G.L. (1988). Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans? [Abstract] *Journal of Hospital Infection*, 12, 29-34.
- Seixas, R., Santos, J.P., Bexiga, R., Vilela, C. & Oliveira, M. (2014). Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis in Portugal. *J Dairy Sci*, 97 (1), 340-344.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. & Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3556-3563.
- Shore, A.C. & Coleman, D.C. (2013). Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 350-359.
- Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. & Coleman, D.C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3765-3773
- Simões, R.R., Aires-de-Sousa, M., Conceição, T., Antunes, F., da Costa, P.M., de Lencastre, H. (2011). High prevalence of EMRSA-15 in Portuguese public buses: a worrisome finding. *PLoS One*, 6(3), e17630.
- Smith, T.C., Gebreyes, W.A., Abley, M.J., Harper, A.L., Forshey, B.M., Male, M.J., Martin, H.W., Molla, B.Z., Sreevatsan, S., Thakur, S., Thiruvengadam, M. & Davies, P.R. (2013). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers on Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. *PLoS One*, 8(5), e63704.
- Sollid, J.U.E., Furberg, A.S., Hanssen, A.M. & Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 531-541.

- Solyman, S.M., Black, C.C., Duim, B., Perreten, V., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Eberlein, L.C., Sadeghi, L.N., Videla, R., Bemis, D.A. & Kania, S.A. (2013) Multilocus Sequence Typing for Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 306-310.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H. & MacKenzie, F.M. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 273-282.
- Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C.A. & Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 2047–2048.
- Tavares, A., Miragaia, M., Rolo, J., Coelho, C., de Lencastre, H. & CA-MRSA/MSSA working group (2013). High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community–hospital boundaries. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(10), 1269-1283.
- Tavares, D.A., Sá-Leão, R., Miragaia, M. & de Lencastre, H. (2010). Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infectious Diseases*, 10, 110.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- Thomas, J.C., Vargas, M.R., Miragaia, M., Peacock, S.J., Archer, G.L. & Enright, M.C. (2007). Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 616-619.
- Türkyılmaz, S., Tekbıyık, S., Oryasin, E. & Bozdoğan, B. (2010). Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk. *Zoonoses and Public Health*, 57, 197-203.
- van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A. & Wertheim, H.F. (2009). Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 1820–1826.
- van Cleef, B.A.G.L., Monnet, D.L., Voss, A., Krziwanek, K., Allerberger, F., Struelens, M., Zemlickova, H., Skov, R.L., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Friedrich, A.W., Spiliopoulou, I., Pászti, J., Hardardottir, H., Rossney, A., Pan, A., Pantosti, A., Borg, M., Grundmann, H., Mueller-Premru, M., Olsson-Liljequist, B., Widmer, A., Harbarth, S., Schweiger, A., Unal, S. & Kluytmans, J.A.J.W. (2011). Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans, in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 502-505.
- van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C, Pyörälä, S., Ruzaukas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J. & Törneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2705–2714.

- Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K. & De Beenhouwer, H. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4609-4612.
- van Wamel, W.J.B., Manásková, S.H., Fluit, A.C., Verbrugh, H., de Neeling, A.J., van Duijkeren, E. & van Belkum, A. (2010). Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 119-122.
- Wedley, A.L., Dawson, S., Maddox, T.W., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Clegg, P., Jamroz, D., Fielder, M.D., Donovan, D., Nuttall, T. & Williams, N.J. (2014). Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: Molecular characterisation of resistance and virulence. *Veterinary Microbiology*, 170, 81-8.
- Weese, J.S. & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140, 418-429.
- Weese, J.S. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *ILAR Journal*, 51(3), 233-244.
- Weese, J.S. (2012). Staphylococcal Infections. In Greene, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4th edition). (pp. 340-348). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Weiβ, S., Kadlec, K., Feβler, A.T. & Schwarz, S. (2013). Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. *Veterinary Microbiology*, 167, 680-685.
- Wettstein Rosenkranz, K., Rothenanger, E., Brodard, I., Collaud, A., Overesch, G., Bigler, B., Marschall, J. & Perreten, V. (2014). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among Swiss veterinary health care providers: detection of livestock- and healthcare-associated clones [Abstract]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 156(7), 317-325.
- Widerström, M., McCullough, C.A., Coombs, G.W., Monsen, T. & Christiansen, K.J. (2012). A Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clone (ST2) Is an Ongoing Cause of Hospital-Acquired in a Western Australian Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2147-2151.
- Wielders, C.L., Vriens, M.R., Briesse, S., de Graaf-Miltenburg, L.A., Troelstra, A., Flier, A., Schmitz, F.J., Verhoef, J. & Fluit, A.C. (2001). In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [Abstract]. *The Lancet*, 357(9269), 1674-1675.
- Zhang, L., Thomas, J.C., Miragaia, M., Bouchami, O., Chaves, F., d'Azevedo, P.A., Aanensen, D.M., de Lencastre, H., Gray, B.M. & Robinson, A. (2013). Multilocus Sequence Typing and Further Genetic Characterization of the Enigmatic Pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS One*, 8(6), e66496.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Resumo aceite para Comunicação Livre (oral) no XXII Congresso Nacional da APMVEAC

Frequência de colonização por staphylococci meticilina-resistente em portadores humanos saudáveis com contacto diário profissional com animais em Portugal

A.C. Rodrigues¹, N. Couto¹, L. Cruz² e C. Pomba¹

¹ Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

²Hospital Veterinário das Laranjeiras, Lisboa, Portugal

Em Portugal, apesar de já existirem alguns dados sobre frequência de colonização e infecção por staphylococci meticilina-resistente (MRS) em animais, tal informação ainda é escassa em portadores humanos saudáveis em contacto diário profissional com animais, sobretudo no que diz respeito aos staphylococci coagulase-negativo meticilina-resistente. O objectivo deste estudo consistiu na avaliação da frequência de colonização por MRS em profissionais veterinários de vários hospitais e clínicas veterinárias.

Foram obtidas zaragatoas nasais de 65 médicos veterinários de animais de companhia, 8 enfermeiros veterinários, 4 auxiliares e 53 estudantes de medicina veterinária. A pesquisa de MRS foi realizada nos meios selectivos cromogénicos Brilliance™ MRSA2 agar (Oxoid) ou ChromID™ MRSA (bioMérieux) e após incubação a 37°C durante 24 a 48h, as colónias suspeitas foram repicadas para placas de agar sangue. A identificação da espécie foi obtida por PCR espécie-específico e a resistência à meticilina foi confirmada por PCR com amplificação do gene *mecA*.

Foram isolados 35 MRS em 32 pessoas (20 médicos veterinários, 4 enfermeiros veterinários, 2 auxiliares e 6 estudantes de medicina veterinária), tendo sido identificados como *Staphylococcus aureus* (MRSA, n=15), *Staphylococcus epidermidis* (MRSE, n=10), *Staphylococcus haemolyticus* (MRSH, n=1), *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP, n=1) e staphylococci coagulase-negativo (MRCoNS, n=8). Verificou-se co-colonização por 2 isolados MRS diferentes em 3 pessoas: 1 médico veterinário colonizado simultaneamente com MRSA e MRSE e 2 estudantes de medicina veterinária, um com MRSE e MRSH e o outro com MRSP e MRCoNS.

Neste estudo identificou-se uma elevada frequência de colonização por MRSA, no entanto a frequência de MRSE não deve ser subestimada. Os profissionais veterinários devem estar

cientes deste problema de saúde pública e animal, pois para além de serem um grupo de risco, actuam como reservatório destes staphylococci multirresistentes.

Anexo 2 – Artigo de revisão submetido à revista *Medicina Veterinária da AEFMV-ULisboa*

***Staphylococcus pseudintermedius* metilina-resistente: do diagnóstico ao tratamento**

A. C. Rodrigues¹, N. Couto¹ e C. Pomba¹

¹Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo: *Staphylococcus pseudintermedius* é um importante agente patogénico oportunista dos animais de companhia, principalmente dos cães. O aparecimento de estirpes de *S. pseudintermedius* metilina-resistente tornou o tratamento das infeções causadas por esta bactéria um enorme desafio para os Médicos Veterinários, em parte devido à multirresistência, que origina importantes limitações terapêuticas, mas também pelo seu potencial zoonótico. Assim, a atempada detecção destas estirpes é essencial para uma adequada terapêutica antimicrobiana e para limitar a sua dispersão na comunidade com adequadas medidas de prevenção e controlo.

Palavras-chave: MRSP, animais de companhia, infeção, *mecA*

Introdução

Staphylococci são agentes comensais comuns da pele e mucosas de pessoas e animais saudáveis, mas também importantes agentes patogénicos oportunistas. Em Medicina Veterinária, as espécies mais importantes são os coagulase-positivo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* (Weese & van Duijkeren, 2010; Bond & Loeffler, 2012; Wedley et al., 2014).

Desde 1976 até recentemente, *Staphylococcus intermedius* era considerado o staphylococci mais comum no cão e o principal agente causador de infeções de pele e tecidos moles (Hajek, 1976; Bannoehr & Guardabassi, 2012; Bond & Loeffler, 2012). No entanto, em 2005, foi descrita uma nova espécie de staphylococci, *S. pseudintermedius*, com base em técnicas moleculares a partir de isolados de cães, gatos, cavalos e papagaios (Devriese et al., 2005). Tal permitiu compreender que a espécie *S. pseudintermedius*, e não o *S. intermedius* como se pensava, é a bactéria mais frequente no microbioma do cão e também a mais frequentemente associado a infeção (Bannoehr et al, 2007; Sasaki et al, 2007; Ghebremedhin et al, 2008; Devriese et al., 2009). Com esta reclassificação das espécies, foi também proposto que todos os isolados com características fenotípicas de “*S. intermedius*” devem ser identificados como *S. pseudintermedius* se forem obtidos de cães, excepto se os testes moleculares indicarem que pertencem a uma espécie relacionada (Devriese et al., 2009).

Resistência à metilina

A resistência à metilina é mediada pela presença do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PLP2 α), para a qual os antibióticos β -lactâmicos têm baixa afinidade, surgindo assim resistência a toda esta classe de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos), que é muitas vezes usada como primeira linha em Medicina Veterinária (Bond & Loeffler, 2012; Frank & Loeffler, 2012).

O gene *mecA* está localizado no cromossoma da bactéria num elemento genético móvel designado “cassete cromossomal *mec* de estafilococos” (“*Staphylococcal Cassette Chromosome*”, SCC*mec*). Este elemento pode ser transferido entre as diferentes espécies de staphylococci (van Duijkeren et al., 2011). A aquisição do SCC*mec* por estirpes de *S. pseudintermedius* foi descrita pela primeira vez na Europa em 2007 (Loeffler et al., 2007). Desde então a frequência de isolamento de estirpes *S. pseudintermedius* metilina-resistente (MRSP – “*Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*”) tem vindo a aumentar (Frank & Loeffler, 2012). Em Portugal, a primeira descrição de MRSP foi em 2009 num gato com infeção do trato urinário (Pomba et al., 2010).

Multirresistência a antibióticos

Apesar das estirpes de MRSP não serem necessariamente mais virulentas que as estirpes metilina-susceptíveis, as opções terapêuticas estão fortemente limitadas pela multirresistência¹ a antibióticos, pois, para além da presença do gene *mecA*, os MRSP apresentam uma enorme variedade de diferentes genes de resistência, o que os torna resistentes a quase todas as classes dos antibióticos comumente utilizadas (van Duijkeren et al., 2011; Cain, 2013). Os isolados de MRPS são normalmente resistentes às fluoroquinolonas (enrofloxacin, marbofloxacin e pradofloxacin), aminoglicosídeos (gentamicin), macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina e lincomicina), sulfonamidas potenciadas (trimetoprim/sulfametoxazole) e por vezes às tetraciclina e ao cloranfenicol (van Duijkeren et al., 2011; Bond & Loeffler, 2012; Bryan et al., 2012; Papich, 2012; Haenni et al., 2014).

Factores de risco para colonização e infeção

Actualmente são escassos os estudos sobre factores de risco para colonização e infeção por MRSP, no entanto é possível que os factores de risco identificados para MRSA possam ser extrapolados para MRSP. Ainda assim um estudo de Weese e outros (2012) identificou como

¹ Resistência a pelo menos 3 classes diferentes de antibióticos, para além dos β -lactâmicos (Coombs & Nimmo, 2004).

factor de risco para infeção por MRSP a prévia administração de antibióticos (principalmente fluoroquinolonas e cefalosporinas) (Weese et al. 2012). Noutro estudo, demonstrou-se que a prévia hospitalização e administração de antibióticos estavam associados a colonização por MRSP em cães (Nienhoff et al., 2011). Apesar de pouco se saber sobre o papel da colonização na infeção é razoável assumir que a colonização possa ser um factor de risco (Bannoehr & Guardabassi 2012).

Manifestações clínicas de infeção por MRSP

S. pseudintermedius é um agente patogénico oportunista, faz parte da microbiota normal da maioria dos cães e só causa doença se as defesas do hospedeiro estiverem diminuídas e a barreira pele alterada por factores predisponentes como dermatite atópica, procedimentos médicos e cirúrgicos e/ou doenças imunossupressoras (Bannoehr & Guardabassi, 2012). A colonização e infeção por MRSP já foram descritas em cães, gatos, cavalos e pessoas (Hanselman et al., 2008; Ruscher et al., 2009; Pomba et al., 2010; Stegmann et al., 2010; Couto et al., 2011; Nienhoff et al., 2011; Savini et al., 2013), no entanto, contrariamente ao que se verifica nos cães, o MRSP parece ser pouco frequente a raro nas outras espécies (Kadlec & Schwarz 2012). Num estudo realizado em Portugal, o MRSP foi apenas detectado em cães, com uma prevalência de colonização de 6,2%, tendo-se verificado que os mesmos tinham 12,7 vezes mais probabilidade de serem positivos comparativamente aos gatos (Couto et al. 2011). À semelhança do que acontece com as frequências de colonização, as infeções por MRSP são menos comuns em gatos (Morris et al., 2006).

MRSP provoca o mesmo tipo de infeções que as estirpes de *S. pseudintermedius* metilina-susceptíveis, desde piodermite superficial e profunda (Figura 1), otites, feridas, infeções pós-cirúrgicas, infeções do trato urinário, infeções respiratórias, artrite séptica, osteomielite, endocardite, abscessos hepáticos, peritonite e infeções oculares (Ruscher et al., 2009; Miedzobrodzki et al., 2010; Perreten et al., 2010; Pomba et al., 2010; Rubin & Gaunt, 2011; Weese et al., 2012; Couto et al., 2013), no entanto há uma maior predominância das infeções de pele, feridas, otites e infeções pós-cirúrgicas (Ruscher et al., 2009; Perreten et al., 2010; Ruscher et al., 2010; Weese, 2012; Couto et al., 2013).



Figura 1 - Cão com piodermite por MRSP (Fonte: original).

Diagnóstico

Um diagnóstico precoce é essencial para prevenir a disseminação de MRSP, devendo-se, em caso de suspeita de infeção, enviar amostras para o laboratório para que se possa fazer a correcta identificação do agente e determinar o seu perfil de susceptibilidade aos antibióticos.

De acordo com as directrizes da Associação Britânica de Veterinários de Pequenos Animais (BSAVA - “*British Small Animal Veterinary Association*”), deve-se suspeitar de infeção por MRSP em:

- Pacientes com feridas que não cicatrizam;
- Pacientes com infeções que não respondem à antibioterapia e em que a citologia e/ou cultura indicou envolvimento de staphylococci;
- Infeções secundárias ou nosocomiais, principalmente em pacientes de risco (animais imunocomprometidos, casos de hospitalizações prolongadas, animais com defeitos de pele e/ou mucosa, e casos cirúrgicos, principalmente procedimentos invasivos e/ou implantes);
- Pacientes com sépsis ou outras infeções invasivas;
- Múltiplos cursos de antibioterapia;
- Pacientes que co-habitam com outros animais com história de infeção por MRSP (BSAVA, 2014).

O tipo de amostras a enviar depende do tipo de infeção que o animal apresenta e pode incluir:

- Zaragatoas de lesões de pele e/ou feridas;
- Implantes ou drenos;
- Urina, se existe infeção de trato urinário;
- Fezes, se o paciente apresentar diarreia;
- Fluido de lavagem brônquica, se infeção respiratória (BSAVA, 2014).

Antes do aparecimento do MRSA como bactéria patogénica para o cão, a identificação de staphylococci coagulase-positivo a nível da espécie em Microbiologia Veterinária, não era relevante em termos clínicos, contudo atualmente a identificação exata da espécie e a diferenciação entre MRSA e MRSP é essencial. Existem diferenças significativas no potencial zoonótico entre estas duas espécies (a probabilidade de transmissão de MRSA dos animais ao homem é muito superior ao do MRSP) e os critérios clínicos para o teste de susceptibilidade *in vitro* são diferentes para determinados antibióticos (Bond & Loeffler, 2012). Uma identificação inicial de staphylococci a nível do género pode ser obtida pela morfologia das colónias em placas de agar sangue (colónias de média dimensão, lisas, convexas, amarelas a brancas), por microscopia (cocos Gram-positivo) e pelo teste de produção da catalase (que permite diferenciar de streptococci e enterococci) (Bond & Loeffler, 2012). Não existem actualmente sis-

temas de identificação comerciais para uma rápida e correta identificação do *S. pseudintermedius* e como é uma espécie relativamente nova ainda não está incluída nas bases de dados da maioria dos sistemas, por isso, é possível que, na maioria dos casos, esta espécie seja erradamente identificada como *S. intermedius* ou *S. aureus* (Bannoehr & Guardabassi, 2012; Bond & Loeffler, 2012). No entanto, recentemente foi desenvolvido um multiplex PCR para identificação de vários staphylococci coagulase-positivos, incluindo o *S. pseudintermedius*, com amplificação do gene *nuc* (codifica a proteína termonuclease) específico de cada espécie (Sasaki et al., 2010).

No que diz respeito à identificação da resistência à meticilina, a maioria dos laboratórios usa métodos fenotípicos, como o teste de difusão de disco e a microdiluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em ambos os testes utiliza-se a oxacilina em vez de meticilina, pois a primeira tem maior sensibilidade e é mais estável em laboratório. Após várias reavaliações dos critérios interpretativos, um comité do CLSI Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing (VAST) elaborou um novo critério interpretativo para o *S. pseudintermedius*: oxacilina $R \geq 0,5$ mg/L na microdiluição e $R \leq 17$ mm na difusão de disco (Papich, 2010; CLSI, 2013). É também possível fazer a identificação de MRSP em placas de agar com meio selectivo cromogénico, como os meios Brilliance™ MRSA2 (Oxoid) e ChromID™ MRSA (bioMérieux) (Figura 2). Ainda assim, o método mais sensível para a detecção da resistência à meticilina é a amplificação do gene *mecA* por PCR (van Duijkeren et al., 2011).

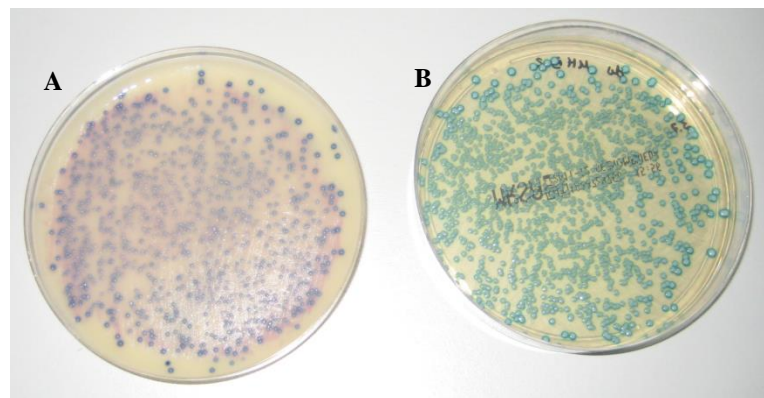


Figura 2 - Isolamento de MRPS em meios selectivos cromogénicos. A) Meio Brilliance™ MRSA2 (Oxoid); B) Meio ChromID™ MRSA (bioMérieux) (Fonte: Original).

Tratamento

O recente aumento do número de estirpes MRSP tem tornado o tratamento destas infeções um desafio para o Médico Veterinário. O tratamento das infeções por MRSP é baseado nos mesmos princípios que o tratamento das infeções por MSSP, geralmente envolvendo tera-

pêutica sistémica e/ou tópica (Frank & Loeffler, 2012). A diferença reside no número de opções antimicrobianas disponíveis para um tratamento bem-sucedido. Embora existam várias opções antimicrobianas para terapêutica de infeções por MSSP, a maior parte dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infeções MRSP não são licenciados para uso veterinário ou são considerados "criticamente importantes" para a Medicina Humana pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). O uso destes antibióticos “criticamente importantes” para a Medicina Humana (WHO, 2009), tal como a vancomicina e a linezolida, é amplamente desaconselhado pelo potencial de selecção de resistência e só pode ser realizado ao abrigo da “cascata” sob responsabilidade do Médico-Veterinário Assistente (Artigo 10 da Directiva 2001/82/EC do Parlamento Europeu e do Conselho). Alguns dos antibióticos apresentados na Tabela 1, apresentam efeitos adversos ou são difíceis de administrar o que pode levar a descontinuação do tratamento e falha subsequente (Frank & Loeffler, 2012; Papich, 2012). Assim sendo o Médico Veterinário tem um papel decisivo e deve monitorizar o seu paciente rotineiramente de forma a evitar a falha terapêutica.

Tabela 1 - Antibióticos que podem ser utilizados no tratamento de infeções por MRSP (adaptado de Hillier et al., 2014).

Antibiótico	Dose	Utilização	Efeitos adversos mais relatados
Cloranfenicol	40-50 mg/kg IM, SC, PO q8h	Infeções de pele e tecidos moles	Alterações gastrointestinais, Aplasia medular
Florfenicol	25-50 mg/kg IM, SC q8h	Infeções de pele e tecidos moles	Alterações gastrointestinais
Minociclina	5-12 mg/kg PO, EV q12h	Infeções de pele e tecidos moles	Alterações gastrointestinais
Amicacina	5-20 mg/kg EV, IM, SC q24h	Infeções de pele, tecidos moles, trato urinário	Nefrotoxicidade e ototoxicidade
Nitrofurantoína	4 mg/kg PO q8h	Infeções do trato urinário	Alterações gastrointestinais e hepatopatias
Fosfomicina	75 mg/kg PO q24h	Infeções do trato urinário e tecidos moles	Nefrotoxicidade

Para além dos antibióticos, os biocidas podem ser utilizados como terapêutica única ou como adjuvantes para o tratamento da pele, ouvido e feridas (Couto et al., 2013). Os biocidas podem também ser usados na descolonização de animais com MRSP (eliminação de portadores assintomáticos). Apesar de estes produtos serem de fácil uso, é necessário salientar que o Médico Veterinário deve chamar atenção dos donos para a sua correta utilização conforme o des-

crito no folheto do produto. Desta forma evita-se o aparecimento e disseminação de mecanismos de resistência aos biocidas.

Na Tabela 2 encontram-se alguns dos biocidas mais utilizados em Medicina Veterinária. A maior parte dos biocidas são vendidos como produtos comerciais, contudo outros (como a amónia quaternária – vulgar lixívia) têm que ser adaptados de outros produtos (Pariser et al., 2013). O mel ou seus derivados tem sido usado desde os tempos antigos para o tratamento de algumas doenças respiratórias e para a cicatrização de feridas cutâneas (Basualdo et al., 2007; Song et al., 2013). Recentemente têm surgido estudos *in vitro* que descrevem que o mel ou seus derivados podem ser utilizados no tratamento de infeções por estafilococos, nomeadamente MRSP (Basualdo et al., 2007; Song et al., 2013). No Laboratório de Resistência aos Antibióticos da Faculdade de Medicina Veterinária e Biocidas é possível realizar testes de susceptibilidade aos Biocidas, tal como se realizam testes de susceptibilidade aos Antibióticos.

Tabela 2 – Biocidas mais utilizados em Medicina Veterinária.

Biocida	Dose de utilização	Produtos comerciais
Clorhexidina	0,15-2%	Champôs, produtos de limpeza da pele, produtos de limpeza dos ouvidos, produtos de limpeza de feridas
Triclosan	0,3%	Champôs
Amónia quaternária (lixívia)	0,2-0,4%	Não
Iodopovidona	4-10%	Produtos de limpeza da pele, produtos de limpeza de feridas
Peróxido de Benzoílo	2,5%	Champôs
Mel ou derivados	10%	Não está disponível para Medicina Veterinária em Portugal

Controlo da infeção hospitalar

Estudos recentes demonstram que estirpes de MRSP podem sobreviver no ambiente hospitalar, nomeadamente no chão das salas de espera e das salas de consulta, nas salas de cirurgia, no internamento, na roupa e até nos telemóveis (van Duijkeren et al., 2011; Julian et al., 2012; Singh et al., 2013). Para além das fomites, as mãos são o principal veículo de contaminação de agentes patogénicos, tais como MRSP (Julian et al., 2012). Assim sendo é necessário um controlo eficaz da infeção hospitalar de forma a prevenir a disseminação de MRSP. A Associação Britânica de Veterinários de Pequenos Animais (BSAVA) apresenta diretrizes para o

controlo de MRSA que são aplicáveis ao controlo de MRSP. As quatro medidas mais importantes de modo a minimizar o risco de transmissão nosocomial:

- Higiene adequada das mãos – a lavagem e desinfeção das mãos deve ser praticada entre os pacientes. As luvas devem ser utilizadas em procedimentos assépticos e descartadas imediatamente depois, no entanto não substituem a lavagem e desinfeção das mãos. As lesões ou feridas da pele devem ser cobertas com materiais impermeáveis para evitar infeção;
- Limpeza do ambiente – todas as superfícies e equipamentos que contactem com os animais devem ser limpas de forma eficaz entre os pacientes. A limpeza de rotina deve ser dividida em tarefas diárias, semanais e mensais, com base no risco de contaminação;
- Desinfeção do ambiente – todas as superfícies e equipamentos que contactem com os animais devem ser desinfetadas de forma eficaz entre os pacientes. Os desinfetantes devem estar prontamente disponíveis e as instruções de utilização devem estar bem visíveis para uma correta utilização (os desinfetantes não são eficazes se existir matéria orgânica - as mãos e as superfícies visivelmente sujas devem ser lavadas antes da desinfeção);
- Educação – Os profissionais veterinários (Médicos, Enfermeiros e Auxiliares) devem estar informados sobre como manter um controlo eficaz da infeção hospitalar - o que inclui como lidar com casos conhecidos ou suspeitos de MRSP, técnicas de limpeza e desinfeção, isolamento e cuidados barreira de pacientes infetados.

Para além destas medidas, é necessário implementar outras medidas aquando da manipulação de pacientes infetados por MRSP:

- Utilização de roupa de proteção descartável (que cubra também os pés), luvas, touca descartável, máscara e se necessário óculos (no caso de libertação de aerossóis);
- Contacto limitado com os profissionais de veterinária (normalmente limitado a um Médico e um Enfermeiro);
- Limpeza e desinfeção da sala de consulta e da sala de espera (caso o animal não tenha sido diagnosticado antes);
- Isolamento numa unidade de doenças infecciosas ou, se tal não for possível, numa jaula sem nenhum contacto com outros animais;
- Limpeza e desinfeção periódica do local onde o paciente está internado;
- Limpeza e esterilização de todo o material e/ou equipamento em contacto com o paciente;
- Lavagem da roupa de cama em contacto com o paciente separadamente do outro material e a mais de 60°C.

Todas estas medidas são essenciais para minimizar o risco de transmissão de MRSP entre animais e dos animais para os Humanos no ambiente hospitalar (Figura 3). Também é do papel dos profissionais veterinários educar os donos dos pacientes sobre os riscos e cuidados a ter com os seus animais infetados por MRSP.

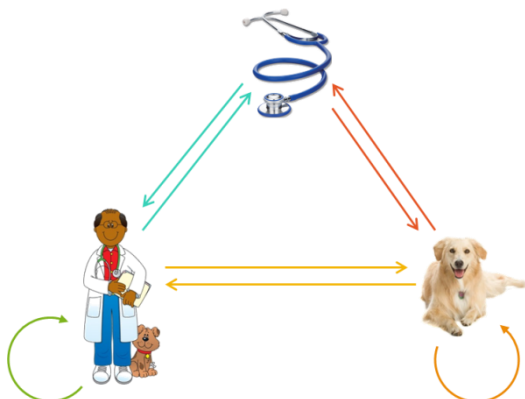


Figura 3 – Os três pilares essenciais de um programa de prevenção e controlo de infeção hospitalar. O estetoscópio representa todo o material e/ou equipamento em contacto com o paciente. Fonte: Original.

Implicações zoonóticas

O MRSP raramente coloniza Humanos, no entanto, a colonização pode ocorrer em indivíduos expostos a animais, tais como os donos e os profissionais veterinários (Bond & Loeffler, 2012; Frank & Loeffler, 2012). A frequência de colonização por MRSP em donos de cães com infeção por MRSP varia entre 4-13% e normalmente ocorre por transmissão cão-dono (Frank & Loeffler, 2012). Em profissionais veterinários a frequência de colonização é ligeiramente inferior, entre 3 e 5,3% (Frank & Loeffler, 2012). Contudo, na maior parte dos casos esta colonização é temporária, desaparecendo em menos de um mês (Frank & Loeffler, 2012). É de salientar, no entanto, que a exposição Humana a estirpes de MRSP pode levar ao desenvolvimento de infeções extremamente difíceis de tratar devido ao perfil multirresistente do MRSP (Bond & Loeffler, 2012). Além disso as estirpes MRSP podem funcionar como veículos do gene *mecA* e de outros genes de resistência aos antibióticos, que podem ser transmitidos a outros staphylococci presentes na microbiota da mucosa e pele de humanos (Bond & Loeffler, 2012).

Referências Bibliográficas

Abraham, J.L., Morris, D.O., Griffeth, G.C, Shofer, F.S. & Rankin, S.C. (2007). Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. *Veterinary Dermatology*, 18(4), 252–259.

- Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H. & Fitzgerald, J.R. (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8685-8692.
- Bannoehr, J. & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, 23, 253–E52.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M.S. & Marioli, J.M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124(3-4), 375-81.
- Bond, R. & Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *The Journal of Small Animal Practice*, 53(3), 147–54.
- British Small Animal Veterinary Association (2014). Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. Acedido em Julho 1, 2014. Disponível em: <http://www.bsava.com/Resources/MRSA.aspx>
- Bryan, J., Frank, L.A., Rohrbach, B.W., Burgette, L.J., Cain, C.L. & Bemis, D.A. (2012). Treatment outcome of dogs with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 1–9.
- Cain, C.L. (2013). Methicillin-Resistant Staphylococcal Infections – Recent Developments. *Today's Veterinary Practice*, 3(3), 26–32.
- CLSI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- Coombs, G. & Nimmo, G. (2004). Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4735–4743.
- Couto, N., Pombo, C., Moodley, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*, 169(3), 1–2.
- Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V., Pombo, C. (2013). Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 2013 Jul 2. [Epub ahead of print]
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(pt4), 1569-1573.

- Devriese, L.A., Hermans, K., Baele, M. & Haesebrouck, F. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*, 133(1-2), 206–207.
- Frank, L.A. & Loeffler, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 283–91, e56.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W. & König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019-1025.
- Griffeth, G.C., Morris, D.O., Abraham, J.L., Shofer, F.S. & Rankin, S.C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, 19(3), 142–149.
- Haenni, M., Moraes, N.A., Châtre, P., Médaille, C., Moodley, A. & Madec, J. (2014). Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.002>
- Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26(4), 401–408.
- Hanselman, B.A., Kruth, S. & Weese, J.S. (2008). Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*, 126(1-3), 277–81.
- Hanselman, B.A., Kruth, S.A., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian Veterinary Journal*, 50 (9), 954–958.
- Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., Guardabassi, L., Papich, M.G., Rankin, S., Turnidge, J.D. & Sykes, J.E. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, 25(3), 163-75, e42-3.
- Julian, T., Singh, A., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2012). Methicillin-resistant staphylococcal contamination of cellular phones of personnel in a veterinary teaching hospital. *BMC Research Notes*, 10(5), 193.
- Kadlec, K. & Schwarz, S. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, 23 (4), 276–e55.

- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M., Winkler, M., Weiss, R. & Lloyd, D.H. (2007). First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18(6), 412-421.
- Miedzobrodzki, J., Kasprowicz, A., Bialecka, A., Jaworska, O., Polakowska, K., Władyka, B., Dubin, A. (2010). The first case of a *Staphylococcus pseudintermedius* infection after joint prosthesis implantation in a dog. *Polish journal of microbiology*, 59(2), 133–135.
- Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S. & Rankin, S.C. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Veterinary Dermatology*, 17(5), 332–337.
- Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N. & McEwen, S.A. (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal*, 50 (10), 1047-1053.
- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I.F., Verspohl, J., Gerlach, G.F., Kreienbrock, L., Schwarz, S., Simon, D. & Nolte, I. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. *Veterinary Microbiology*, 150(1-2), 191–7.
- Papich, M.G. (2010). Proposed changes to Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(1), 160.
- Papich, M.G. (2012). Selection of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: time to revisit some old drugs? *Veterinary Dermatology*, 23(4), 352-360, e64.
- Pariser, M., Gard, S., Gram, D. & Schmeitzel, L. (2013). An *in vitro* study to determine the minimal bactericidal concentration of sodium hypochlorite (bleach) required to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine skin. *Veterinary Dermatology*, 24(6), 632-4, e156-7.
- Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Grönlund Andersson, U., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rosano, A. & Guardabassi, L. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study. *J Antimicrob Chemother*, 65(6), 1145–1154.
- Pomba, C., Couto, N. & Moodley, A. (2010). Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of feline medicine and surgery*, 12(10), 802–6.

- Rubin, J.E. & Chirino-Trejo, M. (2011). Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(2), 351–354.
- Rubin, J.E. & Gaunt, M.C. (2011). Urinary tract infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(2), 162–164.
- Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Wleklinski, C.G., Soba, A., Wieler, L.H. & Walther, B. (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 197–201.
- Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Semmler, T., Wleklinski, C.G., Paasch, A., Soba, A., Stamm, I., Kopp, P., Wieler, L.H. & Walther, B. (2010). Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 340–6.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S. & Hiramatsu, K. (2007). Re-classification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770-2778.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 765–9.
- Savini, V., Barbarini, D., Polakowska, K., Gherardi, G., Białecka, A., Kasproicz, A., Polilli, E., Marrollo, R., Di Bonaventura, G., Fazii, P., D'Antonio, D., Miedzobrodzki, J. & Carretto, E. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1636–8.
- Singh, A., Walker, M., Rousseau, J., Monteith, G.J. & Weese, J.S. (2013). Methicillin-resistant staphylococcal contamination of clothing worn by personnel in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Surgery*, 42(6), 643-8.
- Song, C.Y., Nam, E.H., Park, S.H. & Hwang, C.Y. (2013). *In vitro* efficacy of the essential oil from *Leptospermum scoparium* (manuka) on antimicrobial susceptibility and bio-film formation in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(4), 404-8, e87.
- Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C.A. & Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 2047–8.
- van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., Ruzaukas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J. & Törneke, K. (2011). Review on

methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2705–14.

- van Duijkeren, E., Kamphuis, M., van der Mije, I.C., Laarhoven, L.M., Duim, B., Wagenaar, J.A. & Houwers, D.J. (2011). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4), 338-43.
- Wedley, A.L., Dawson, S., Maddox, T.W., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Clegg, P., Jamrozy, D., Fielder, M.D., Donovan, D., Nuttall, T. & Williams, N.J. (2014). Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: Molecular characterisation of resistance and virulence. *Veterinary Microbiology*, 170 (1-2), 81–8.
- Weese, J.S. (2012). Staphylococcal control in the veterinary hospital. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 292-8, e57-8.
- Weese, J.S., Faires, M.C., Frank, L.A., Reynolds, L.M. & Battisti, A. (2012). Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(12), 1450–1455.
- World Health Organization—Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (2009). Acedido em Março 16, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16735e/s16735e.pdf>

Anexo 3 – Resumo aceite para Comunicação Livre em painel no 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections 2014, Chicago, EUA

Healthy people in professional daily contact with animals: a follow-up study of nasal colonization by methicillin-resistant staphylococci

Ana Catarina Rodrigues¹, Natacha Couto¹, Luís Cruz², Luís Telo Gama³ e Constança Pomba¹

¹ Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

²Hospital Veterinário das Laranjeiras, Lisboa, Portugal;

³CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Keywords (max. 5): methicillin-resistant staphylococci, colonization, persistence, veterinary professionals

Colonized veterinarians and people with daily contact with animals may have an important role in the introduction and transmission of methicillin-resistant staphylococci (MRS). The objective of this study was to investigate colonization and persistence of MRS in veterinary professionals. Nasal swabs were collected from 71 veterinarians, 34 veterinary students and 23 veterinary nurses and technicians from one veterinary teaching hospital, 5 hospitals and 10 clinics in Lisbon, Portugal. Staphylococci growth was quantitatively assessed in Mannitol Salt Agar and BrillianceTM MRSA2 agar (Oxoid). Species identification was obtained by species-specific PCR. Methicillin-resistance was confirmed by PCR amplification of the *mecA* gene. Strains were characterized by *spa*, *SCCmec*, MLST and PFGE typing. A total of 122 people out of 128 were colonized with staphylococci and 78 with one or more MRS (60.9%) (*S. epidermidis*, *n*=59; *S. aureus*, *n*=19; *S. haemolyticus* *n*=6; *S. pseudintermedius* *n*=2; *Staphylococcus* spp, *n*=7). Being a veterinarian was found to be a significant risk factor for MRS colonization. In 22 cases MRS co-colonization (10 to uncountable CFU/ml) was present, with MRSA and MRSE strains being the most frequent (*n*=7). Representative MRSA isolates (*n*=7) were characterized as livestock-associated MRSA ST398-*SCCmecV* (t108, *n*=3), and the major healthcare EMRSA-15 clone in Portugal ST22-*SCCmecIV* (t032, *n*=3), and also ST5 (t002, *n*=1). One MRSP was the European ST71-*SCCmecII-III* lineage. A follow-up study of 24 carriers revealed that MRS persisted for at least 1 month in the nasal cavity, except in one MRSP carrier. This study highlights the need to control the spread of MRS in the veterinary healthcare setting.

Anexo 4 – Resumo aceite para Comunicação Livre em painel no 24th *European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals Congress 2014, Mainz, Alemanha*

High frequency of colonization by methicillin-resistant staphylococci in healthy humans in daily contact with animals in Portugal

Rodrigues, A.C.¹, Couto, N.¹ e Pomba, C.¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, LISBOA, Portugal

Reports of methicillin-resistant staphylococci (MRS) in animals have become more frequent in last years. Various studies have demonstrated the transmission of MRSA between animals and humans in daily contact with animals, however there is only limited data so far available on the transmission of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci between animals and humans. The objective of this study was to investigate the frequency of methicillin-resistant staphylococci (MRS) carriage in healthy veterinarians, veterinary nurses, veterinary assistants, veterinary students and farm workers from several veterinary hospitals, clinics and farms.

Nasal swabs were collected from 72 veterinarians (60 small animal veterinarians and 12 pig veterinarians), 8 veterinary nurses, 53 veterinary students, 4 veterinary assistants and 11 farm workers. MRS were screened on BrillianceTM MRSA2 agar (Oxoid) or ChromIDTM MRSA (bioMérieux). After 24-48h of incubation at 37°C, suspected colonies on both media were subcultured onto blood agar plates. Species identification was obtained by species-specific PCR. Methicillin-resistance was confirmed by PCR amplification of the *mecA* gene. MRSA isolates were characterized by MLST.

Thirty-nine MRS were identified in 38 humans (23 veterinarians, 2 veterinary nurses, 7 veterinary students, 2 veterinary assistants and 5 farm workers). The MRS isolates were identified as *Staphylococcus aureus* (MRSA, n=23), *S. epidermidis* (MRSE, n=9), *S. pseudintermedius* (MRSP, n=1), *S. haemolyticus* (MRSH, n=1) and 5 MRS coagulase-negative staphylococci. The frequency of colonization by MRS was similar in both small animals and pigs veterinarians ($\pm 30\%$). One veterinary student was colonized simultaneously with an MRSE and an MRSH. The predominant ST in humans in contact with small animals was ST22 and in humans in contact with pigs was ST398.

In our study the frequency of colonization by MRSA was high, but the frequency of MRSE should not be underestimated. MRSA isolates in this work belonged mainly to the ST22 lineage which is the most frequent in small animals and humans in Europe. Humans in daily contact with animals can become colonized by MRS of animal origin and thus are important keys for infection control programs in Veterinary Hospitals and Farms.

Anexo 5 – Resumo aceite para Comunicação Livre no 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhaga, Dinamarca

Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* in Portugal – a comparison between companion animals and humans in close contact

N. Couto*, A.C. Rodrigues, A. Belas, C. Marques, C. Pomba (FMV, UL, Lisbon, PT)

Objectives: To compare the genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) and methicillin-resistant *S. haemolyticus* (MRSH) between clinical isolates from companion animals and colonization isolates from humans in close contact with animals.




Methods: 78 colonization isolates (n=69 MRSE and n=9 MRSH) from humans in contact with animals (n=47 veterinarians, n=10 veterinary students and n=21 veterinary nurses) and 19 clinical isolates (n=10 MRSE and 9 MRSH) from dogs (n=11) and cats (n=8) were selected from a collection of staphylococcal isolates existing in the Antibiotic Resistance Laboratory FMV-UL. All isolates were subjected to SCCmec typing and underwent PFGE analysis after *Sma*I restriction. Isolates were considered in the same cluster if they had more than 80% similarity using the DICE coefficient (1.0% optimization and 1.7% tolerance). Representative MRSE isolates were also typed by Multi-locus Sequence Typing (MLST).

Results: MRSE harboured SCCmec types II (n=5), III (n=1), IV (n=32), V (n=2), VI (n=1) and non-typeable (NT) (n=38), while MRSH harboured SCCmec types V (n=7) and NT (n=11). Analysis obtained by *Sma*I restriction revealed sixteen clusters in MRSE isolates and seven clusters in MRSH isolates. In MRSE, 4 clusters included both companion animal and human strains, 3 clusters had only animal strains and 9 clusters included only human strains. In MRSH, 2 clusters had both animal and human strains, 2 clusters had only animal strains and 3 clusters had only human strains. Representative MRSE strains of some clusters were subjected to MLST and 7 sequence types (ST) were identified: ST2 (n=1 animal), ST5 (n=2 animal and n=2 human), ST20 (n=1 animal), ST23 (n=1 animal), ST35 (n=1 animal and n=3 human), ST57 (n=1 animal) and ST190 (n=1 animal). All these ST belong to clonal complex (CC) 5.

Conclusions: In this study MRSE and MRSH strains from companion animals and humans in close contact with animals in Portugal were compared. ST5 and ST35 clonal lineages appeared both in companion animals and humans, which indicates that such lineages may have low host specificity and may be transmitted between companion animals and humans and vice-versa. This was expected since MRSE CC5 circulates in human hospitals and in the community in Portugal. Companion animals may have a role in this cycle.

Anexo 6 – Questionário entregue aos participantes com instrução escrita relativa à coleta da amostra

6.1. Frente do questionário

 QUESTIONÁRIO  	
“Prevalência de MRSA e MRSP em grupos de risco”	
1	<p>Nome: _____</p> <p>Instituição: _____</p> <p>Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/></p> <p>Data nascimento: ____/____/____</p> <p>Profissão: <input type="checkbox"/> Médico Veterinário</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> Enfermeiro Veterinário</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> Auxiliar Veterinário</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> Estudante de Medicina Veterinária (ano: _____)</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> Outra: _____</p> <p>Há quanto tempo? <input type="checkbox"/> Menos 1 ano <input type="checkbox"/> Mais 1 ano</p> <p>Qual a sua especialidade?</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> Medicina Interna <input type="checkbox"/> Cirurgia <input type="checkbox"/> Imagiologia <input type="checkbox"/> Outra: _____</p>
	<p>Nº amostra: _____</p> <p>Data: ____/____/____</p>
2	<p>Tomou algum antibiótico nos últimos 6 meses? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, qual? _____ Para quê? _____</p> <p>Tomou algum antibiótico no último ano? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, qual? _____ Para quê? _____</p> <p>Teve alguma infecção de pele nos últimos 6 meses que necessitasse de tratamento (ex. abscesso, úlcera com pús)? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p>Tem alguma doença crónica (ex. asma, diabetes)? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, qual? _____</p> <p>Já realizou alguma cirurgia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p>Já teve, anteriormente, alguma infecção por MRSA? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, foi tratado com quê? _____</p> <p>Fuma? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
3	<p>No último ano:</p> <p>Foi a algum centro de saúde? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p>Ficou internado em algum hospital? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p>Viajou para o estrangeiro? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, para onde? _____</p> <p style="padding-left: 40px;">Esteve em algum hospital lá? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p> <p style="padding-left: 40px;">Se sim, quanto tempo? _____</p>

Vire sff.

6.2. Verso do questionário

4	Diagnosticou/Tratou recentemente algum animal com infeção por MRSA ou MRSP? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei Há quanto tempo? _____
---	---

5	Tem alguém na sua família que vá regularmente a hospitais/centros de saúde por motivos de doença ou profissão? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
---	--

6	Tem animais em casa? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se sim, qual? <input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> Gato <input type="checkbox"/> Outro: _____ O seu animal já teve alguma infeção que necessitasse de antibioterapia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não O seu animal visita regularmente clínicas ou hospitais por motivos de doença? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não O seu animal tomou algum antibiótico nos últimos 6 meses? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se sim, qual? _____
---	--

Colheita de amostra:

Introduzir a zaragatoa, cerca de 1 cm, na narina e rodá-la contra a mucosa durante 5 segundos aproximadamente.

Nº Zaragatoas: ☐ 1 ☐ 2

E-mail	
--------	--

Obrigada pela participação!

Os resultados deste questionário são **confidenciais** e serão apenas utilizados para
Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da aluna estagiária,
Ana Catarina Rodrigues.

Anexo 7 – Lista de oligonucleótidos utilizados nos vários protocolos de PCR realizados**Tabela 12** – Lista de oligonucleótidos com as respectivas sequências, tamanho de produto e referência.

Oligonucleótidos	Sequência de nucleótidos (5' - 3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência	
XylF	AACGCGCAACGTGATAAAATTAATG	539	Morot-Bizot et al., 2004	
XylR	AACGCGCAACAGCAATTACG			
Sap1	TCAAAAAGTTTCTAAAAAATTTAC	221		
Sap2	ACGGGCGTCCACAAAATCAATAGGA			
Se705-1	ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA	124		
Se705-2	CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA			
TstaG 422	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA	370		
Tsatg765	TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA			
sch-F	AATGGCTACAATGATAATCACTAA	526		Sasaki et al., 2010
sch-R	CATATCTGTCTTTTCGGCGCG			
pse-F2	TRGGCAGTAGGATTCGTAA	926		
pse-R5	CTTTTGTGCTYCMTTTTGG			
int-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430		
int-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC			
Sh-1	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	271	Pereira et al., 2010	
Sh-2	CACGAGCAATCTCATCACCT			
SimF	ATCCTTTCACCTAACTCTGAAGAG	197	Blaiotta et al., 2005	
SimR	GTAATTGGGTGTCTTGGTTTGCT			
mecA-1	GGGATCATAGCGTCATTATTC	527	Poulsen et al., 2003	
mecA-2	AACGATTGTGACACGATAGCC			
nuc-1	TCAGCAAATGCATCACAAACAG	255		
nuc-2	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG			
16S-1	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	886		
16S-2	AGACCCGGAACGTATTAC			
mecLGA251f	GCTCCTAATGCTAATGCA	304		Cuny et al., 2011
mecLGA251r	TAAGCAATAATGACTACC			
A07F	GATCCCAGAATACTTAAATA	197		van Wamel et al., 2010
A07R	TGACCGTAATCTTGTAATA			
C01F	CATTCATCACACGTATATTC	140		
C01R	GGTGATTATTCATGGTTAAG			
luk-PV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	Lina et al., 1999	
luk-PV-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC			
spa1095new	AGACGATCCWTCAGTGAG	variável	Shopsin et al., 1999	
spaextend_f	TAATCCACCAAATACAGTTGTACC			
arc up	TTGATTACACGCGGTATTGTC	456	Enright et al., 2000	
arc dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG			
aro up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456		
aro dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC			
glp up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465		
glp dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC			
gmK up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429		
gmK dn	TCATTAACACAAACGTAATCGTA			
pta up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474		
pta dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA			

tpi up	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402	
tpi dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
yqi up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516	
yqi dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		
arc-F	TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG	465	
arc-R	TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG		
aroE-F	CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC	420	
aroE-R	CAAGCGAAATCTGTTGGGG		
gtr-F	CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT	438	
gtr-R	GTGATTAAAGGTATTGATTGAAT		
mutS-F3	GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA	412	Thomas et al., 2007
mutS-R3	GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT		
pyr-F2	GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT	428	
pyr-R4	GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA		
tpi-F2	ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC	424	
tpi-R2	TTAATGATGCGCCACCTACA		
yqiL-F2	CACGCATAGTATTAGCTGAAG	416	
yqiL-R2	CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA		
tuf-F	CAATGCCACAAACTCG	500	
tuf-R	GCTTCAGCGTAGTCTA		
cpn60-F	GCGACTGTACTTGCACAAGCA	552	
cpn60-R	AACTGCAACCGCTGTAAATG		
pta-F	GTGCGTATCGTATTACCAGAAGG	570	
pta-R	GCAGAACCTTTTGTTGAGAAGC		
purA-F	GATTACTTCCAAGGTATGTTT	490	Solyman et al., 2013
purA-R	TCGATAGAGTTAATAGATAAGTC		
fdh-F	TGCGATAACAGGATGTGCTT	408	
fdh-R	CTTCTCATGATTCACCGGC		
ack-F	CACCACTTCACAACCCAGCAAACCT	680	
ack-R	AACCTTCTAATACACGCGCACGCA		
sar-F	GGATTTAGTCCAGTTCAAAATTT	521	
sar-R	GAACCATTCGCCCCATGAA		
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286	
mA2	AACGTTGTAACCACCCAAGA		
α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695	Kondo et al., 2007
α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937	
α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	1791	
βc ^a	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
α4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	1287	
β4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTT		
γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518	
γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	1963	
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2827	
IS2	TGAGGTTATTTCAGATATTTTCGATGT	804	
mA7 ^b	ATATACCAAACCCGACAACCTACA		

^aFunciona como oligonucleótido *reverse* dos oligonucleótidos *forward* $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$; ^bFunciona como oligonucleótido *reverse* dos oligonucleótidos *forward* mI6, IS7 e IS2.

Anexo 8 – Frequências de resposta às perguntas do questionário feito aos participantes**Tabela 13** – Frequências de resposta às perguntas do questionário.

	Sim		Não		Não sei ^c		NR ^a		Total	
	<i>n</i>	FR ^b	<i>n</i>	FR ^b	<i>n</i>	FR ^b	<i>n</i>	FR ^b	<i>n</i>	FR ^b
Antibiótico nos últimos 6 meses	30	23,3%	99	76,7%	-	-	0	0,0	129	100,0%
Antibiótico no último ano	42	32,6%	82	63,6%	-	-	5	3,9%	129	100,0%
Infecção de pele nos últimos 6 meses	12	9,3%	114	88,4%	-	-	3	2,3%	129	100,0%
Doença crónica	31	24,0%	97	75,2%	-	-	1	0,8%	129	100,0%
Realizou alguma cirurgia	64	49,6%	63	48,8%	-	-	2	1,6%	129	100,0%
Infecção anterior por MRSA	0	0,0%	129	100,0%	-	-	0	0%	129	100,0%
Fumar	21	16,3%	106	82,2%	-	-	2	1,6%	129	100,0%
Animal com MRSA ou MRSP	34	26,4%	59	45,7%	24	18,6%	12	9,3%	129	100,0%
Último ano_Centro de saúde	84	65,1%	45	34,9%	-	-	0	0%	129	100,0%
Último ano_Internado em algum hospital	10	7,8%	118	91,5%	-	-	1	0,8%	129	100,0%
Último ano_Viajou para o estrangeiro	72	55,8%	56	43,4%	-	-	1	0,8%	129	100,0%
Familiar_Hospitais/Centro de saúde	65	50,4%	64	49,6%	-	-	0	0%	129	100,0%
Animais em casa	99	76,7%	30	23,3%	-	-	0	0%	129	100,0%

^aNR: Não respondeu; ^bFR: Frequência relativa (%); ^cOpção de resposta disponível apenas para a pergunta “Diagnosticou/Tratou recentemente alguma animal com infecção por MRSA ou MRSP?”.

Anexo 9 – Caracterização molecular das estirpes MR-CoNS por tipagem SCCmec**Tabela 14** – Diversidade de SCCmec nas estirpes MR-CoNS (MRSE [n=68], MRSH [n=7] e outros MR-CoNS [n=4]).

Complexo do gene <i>mec</i> ^a	Complexo do gene <i>ccr</i> ^b	Tipo de SCCmec ^c	Espécie de MR-CoNS (estirpe, n)
A	A2B2	II	<i>S. epidermidis</i> (4)
	A3B3	III	<i>S. epidermidis</i> (1)
	C	NT	<i>S. epidermidis</i> (1), outros CoNS (4)
	A2B2 + C	NT	<i>S. epidermidis</i> (1)
	A2B2+ Novo1	NT	<i>S. epidermidis</i> (2)
	ND	NT	<i>S. epidermidis</i> (2)
B	A2B2	IV	<i>S. epidermidis</i> (30)
	A4B4	VI	<i>S. epidermidis</i> (1)
	ND	NT	<i>S. epidermidis</i> (1), <i>S. haemolyticus</i> (1)
C2	C	V	<i>S. epidermidis</i> (3), <i>S. haemolyticus</i> (2)
	A2B2 + C	NT	<i>S. epidermidis</i> (6)
	A4B4 + C	NT	<i>S. epidermidis</i> (1)
	C + Novo1	NT	<i>S. epidermidis</i> (1), <i>S. haemolyticus</i> (1)
	A2B2 + C + Novo1	NT	<i>S. epidermidis</i> (1)
	ND	NT	<i>S. epidermidis</i> (1)
NT	A2B2	NT	<i>S. epidermidis</i> (9)
	A4B4	NT	<i>S. haemolyticus</i> (1)
	ND	NT	<i>S. epidermidis</i> (3), <i>S. haemolyticus</i> (2)

^aNT: Não Tipável; ^bND: Não Detectado, Novo1: banda identificada no M-PCR1 sem tipo *ccr* atribuído pelo protocolo utilizado e pelo sistema de classificação actual; ^cNT: Não Tipável.